

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

El corregulador transcripcional PadA regula el crecimiento y el desarrollo
en *Dictyostelium discoideum*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ane Garciandía Sesma

Directora

Teresa Suárez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**El corregulador transcripcional PadA regula el crecimiento y el
desarrollo en *Dictyostelium discoideum***

TESIS DOCTORAL

Ane Garciandia Sesma

Madrid, 2012



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Biología

Departamento de Genética

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Centro de Investigaciones Biológicas

El corregulador transcripcional PadA regula el crecimiento y el desarrollo en *Dictyostelium discoideum*

Memoria presentada por **Ane Garciandia Sesma** para optar al grado de Doctora en Genética por la Universidad Complutense de Madrid.

Trabajo dirigido por la Dra. Teresa Suárez González en el Centro de Investigaciones Biológicas.

Ane Garciandia Sesma

Madrid, 2012



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Teresa Suárez González, científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrita al Centro de Investigaciones Biológicas,

CERTIFICA

Que **Ane Garciandia Sesma**, Licenciada en Biología por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado:

“El corregulador transcripcional PadA regula el crecimiento y el desarrollo en *Dictyostelium discoideum*”

y considera que el trabajo reúne las condiciones científicas necesarias para ser presentada como Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente documento en Madrid, a 23 de Marzo de 2012.

Fdo. Dra. Teresa Suárez González

“Casi todo lo que realice será insignificante,
pero es muy importante que lo haga”

Mahatma Gandhi

“Todo lo que es hermoso tiene su instante, y pasa”

Luis Cernuda

A Miren

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, que ve su fin con estas palabras, es el compendio de momentos infinitos que no han transcurrido en soledad. Por ello, quisiera trasladar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en el camino.

A Teresa Suárez, la directora de esta Tesis, por su confianza, trabajo, paciencia, disposición y comprensión, y lo más importante, por la oportunidad de aprender que me ha brindado.

A Enrique de la Rosa, por creer en este hermoso organismo modelo y apoyar este trabajo.

A Flora de Pablo, Patricia Boya y Catalina Hernández, por su interés, ayuda y disposición continuas, en lo científico y en lo humano.

A Cristina Vega y Francisco Fernández, por su valiosa aportación a este trabajo, su amabilidad y entusiasmo.

Al Dr. Eichinger por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio.

A Ricardo, Leandro, María, Sergio, Javi, Ana y Natalia. Ha sido un placer compartir seminarios y aprender sobre temas de dictiostélidos y otros asuntos igualmente agradables con vosotros.

A todas las personas de los servicios del CIB que facilitan el trabajo a diario.

A Patri V., por su apoyo y disposición infinitos, por devolverse al camino cuando me desviaba y por tantas cosas más.

A Natalia, por su amistad sin sombras.

A María, por la alegría, la ilusión y las palabras sinceras.

A Marta, por su apoyo y cariño.

A Sergio, por hacer más alegre cada día, por ser especial.

A Ana R. y Esther H., por muchos momentos, por vuestra ayuda desinteresada y generosidad. A Violeta, por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Noemí, Josetxu, Alberto, José Luis y Carolina, por ser excelentes compañeros.

A Tany, Esther S., Lucía, Lorena, Kike I., Isabel, Sandra, Chus, Miguel, y Jose M^a, por facilitar siempre las cosas, su amabilidad y generosidad.

A Kike, que empezamos y terminamos esta etapa juntos.

A los que marcharon pero compartieron parte del camino conmigo: Jimena, Marian, Beatriz, Óscar, Ana A., Estí... por la aportación de cada uno. A mis antiguos vecinos del 302: Luque, María, Mariano y Pilar, por hacer más agradable cada día. A Leo y Javi, por su amabilidad.

A Carmen, por su apoyo, ¡pronto descansaremos y disfrutaremos!

A Jan y Khalid, por hacer más agradable mi aventura germana.

A Solé, por guiarme, por su serenidad y dedicación, por ayudarme a creer en mí.

A Iker e Idoia, por su cariño, entusiasmo y el impecable trabajo en la maquetación de esta tesis.

A Maite, Lorea y Miren, porque siempre estáis.

A Ane, mucho ánimo, todo llega a su fin.

A Mamen, Lorena, Puri, Maider, Eider, Erika, Nekane, Regina, Carlos, Ana, Karlos, Laida, Virginia, Zalao y Laida U., por muchos motivos.

A muchas otras personas que también han hecho posible este trabajo y no están contempladas en estas líneas.

A mi familia, a la amama Carmen.

A Cristina, por su apoyo constante durante estos años.

A Pedro e Iñaki, por la ilusión que les hace y que transmiten.

A mis padres, por todo.

A Unai, por su paciencia, fuerza y cariño inquebrantables.

A Miren, por una lección de vida inolvidable.

Gracias a todos.

Eskerrik asko guztioi.

RESUMEN

Dictyostelium discoideum constituye un valioso sistema modelo de fácil manejo. Esta ameba, que vive en el suelo, se encuentra en la frontera entre la unicelularidad y la pluricelularidad, ya que es capaz de formar estructuras de desarrollo tras un proceso genéticamente controlado que incluye comunicación celular, movimiento, diferenciación celular, muerte celular y morfogénesis. En este trabajo, se ha caracterizado el papel de la proteína *NmrA-like* PadA, en el crecimiento y el desarrollo de *D. discoideum*.

La proteína PadA es necesaria para el crecimiento de *D. discoideum* y es esencial en condiciones de restricción nutricional. El análisis transcripcional por micromatrices muestra que genes implicados en la biosíntesis de proteínas y en el metabolismo de azúcares están desregulados en el mutante *padA*, aunque el número de genes diferencialmente regulados es pequeño.

La agregación de las amebas en los primeros estadios del desarrollo de *D. discoideum* se produce por pulsos sincrónicos de AMPc, emitidos por las propias células y a cuyo gradiente responden quimiotácticamente. Estos pulsos, generados por la perfecta coordinación de síntesis y degradación de AMPc, están finamente controlados y definen el tamaño final del organismo. El mutante *padA*⁻ es incapaz de formar territorios de agregación del tamaño correcto, tiene menor actividad fosfodiesterasa que el tipo silvestre y su respuesta quimiotáctica al AMPc está comprometida. Todos estos defectos se deben a que no se alcanzan los niveles silvestres de expresión de los genes implicados en el relé de AMPc, y la sobre-expresión del receptor de AMPc, CarA, rescata el tamaño del territorio.

Los datos obtenidos de comparación de secuencias, análisis filogenético y validación de dominios funcionales de la proteína, permite definir a PadA como un homólogo de NmrA/NMRAL1. Estas proteínas, poco conocidas, se han propuesto como sensores metabólicos capaces de modificar la regulación de la transcripción génica, y en el caso de PadA, se ha comprobado que es necesaria para el crecimiento vegetativo y que tiene un papel en la transcripción génica de los genes del inicio del desarrollo.

1 INTRODUCCIÓN	29
1.1 GENERALIDADES, APUNTES HISTÓRICOS Y FILOGENIA	31
1.2 GENOMA Y PROTEOMA	33
1.3 ORGANISMO MODELO	34
1.4 CICLO DE VIDA	35
1.4.1 FASE VEGETATIVA. ESTADIO UNICELULAR	35
1.4.2 FASE MULTICELULAR	36
1.4.2.1 Detección de ausencia de nutrientes y agregación	36
1.4.2.2 Desarrollo terminal	37
1.4.3 DIFERENCIACIÓN CELULAR	38
1.4.3.1 Factores que inducen la diferenciación celular	40
1.5 LA TRANSICIÓN CRECIMIENTO-DESARROLLO (GDT: GROWTH-DEVELOPMENT TRANSITION)	41
1.5.1 PSF Y YAKA	41
1.5.2 CMF: <i>Conditioned Medium Factor</i>	42
1.6 AGREGACIÓN Y AMP CÍCLICO	44
1.6.1 LA AGREGACIÓN ESTÁ MEDIADA POR LA QUIMIOTAXIS HACIA EL AMPc	44
1.6.2 EL INICIO DE LA AGREGACIÓN ES UN PROCESO ESTOCÁSTICO	45
1.6.3 SEÑALIZACIÓN CELULAR DEL AMPc Y POLARIZACIÓN	46
1.6.4 SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE GMPc	48
1.7 COMPONENTES Y REGULACIÓN DEL RELÉ DEL AMPc	49
1.7.1 RECEPTORES DE AMPc (CAR)	49
1.7.1.1 El proceso de desensibilización de CarA para adaptar el relé	50
1.7.1.2 Regulación transcripcional de <i>carA</i>	50
1.7.2 ADENILATO CICLASAS	51
1.7.2.1 Regulación transcripcional de <i>acaA</i>	52
1.7.3 FOSFODIESTERASAS	53
1.7.3.1 Fosfodiesterasa extracelular de la agregación: PdsA	53
1.7.3.2 Regulación transcripcional de <i>pdsA</i>	54
1.7.3.3 Pdi (<i>phosphodiesterase inhibitor</i>)	55
1.7.4 OTROS COMPONENTES DEL RELÉ DE AMPc	56
1.7.5 REGULACIÓN DEL RELÉ DE AMPc	56
1.7.6 AMPc DURANTE LA CULMINACIÓN	57
1.8 ADHESIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE <i>D. DISCOIDEUM</i>	58
1.8.1 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN (CAM) EN EL DESARROLLO DE <i>D. DISCOIDEUM</i> .	58
1.8.1.1 Adhesión célula-célula	59
1.8.1.1.1 CadA (<i>calcium adhesion protein</i>)	59
1.8.1.1.2 CsA (<i>contact sites A</i>)	60
1.8.1.1.3 TgrC (<i>tiger C</i>)	60
1.8.1.2 Adhesión célula-sustrato	61

1.9	REGULACIÓN DEL TAMAÑO EN <i>D. DISCOIDEUM</i>	61
1.9.1	LOS PULSOS DE AMPc REGULAN EL TAMAÑO INICIAL DEL TERRITORIO	62
1.9.2	<i>COUNTING FACTOR</i>	62
1.9.2.1	CF y glucosa	63
1.9.2.2	Regulación del CF	63
1.10	PADA (Prestalk A Differentiation)	64
1.10.1	EL MUTANTE <i>padA</i> ⁻	64
1.10.1.1	PadA contiene un dominio tipo NmrA	64
1.10.2	HSCARG (NMRL-1:HUMAN <i>NMRA-LIKE</i> -1)	66
1.10.3	MTF (<i>Metabolic Transcription Factors</i>)	67
2	OBJETIVOS	69
3	MATERIAL Y MÉTODOS	73
3.1	CEPAS DE <i>D. DISCOIDEUM</i> EMPLEADAS	75
3.1.1	CEPA SILVESTRE Y CEPAS CONSTRUÍDAS EN EL LABORATORIO	75
3.1.2	CEPAS CEDIDAS POR OTROS LABORATORIOS	76
3.2	OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA PCR	76
3.2.1	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	76
3.2.2	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PLASMÍDICO PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PADA	79
3.3	VECTORES Y CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS	79
3.3.1	VECTORES COMERCIALES	79
3.3.2	CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS OBTENIDAS DEL "STOCK CENTER" DE <i>DICTYBASE</i>	79
3.3.3	CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS CEDIDAS POR OTROS INVESTIGADORES	80
3.4	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	80
3.4.1	EXTRACCIÓN DE ADN	80
3.4.1.1	Extracción de ADN genómico	80
3.4.1.2	Extracción de ADN plasmídico	80
3.4.2	EXTRACCIÓN DE ARN	81
3.4.2.1	Extracción de ARN del desarrollo temprano	81
3.4.3	SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)	81
3.4.3.1	Tratamiento del ARN total con ADN-asa	81
3.4.3.2	Transcripción reversa del ARN total con cebador Oligo (dT)12-18	81
3.4.4	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	81
3.4.4.1	RT-PCR semi-cuantitativa	82
3.4.4.2	RT-PCR cuantitativa en tiempo real	82
3.4.4.3	Purificación de fragmentos de PCR	83
3.4.5	CLONAJES	83
3.4.5.1	Digestión con endonucleasas de restricción	83
3.4.5.2	Reacción de ligación	83
3.4.5.3	Transformación de bacterias	84
3.4.5.3.1	Bacterias competentes	84
3.4.5.3.1.1	Bacterias para expresión proteica	84

3.4.6	SECUENCIACIÓN DE ADN	84
3.5	OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-PADA	84
3.5.1	PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA PADA	84
3.5.1.1	Clonaje de PadA en pET19 y transformación de <i>E.coli</i> BL21	84
3.5.1.2	Inducción de la proteína PadA en <i>E.coli</i> BL21 DE3 pLysS	85
3.5.1.3	Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC)	85
3.5.1.4	Cuantificación de la proteína purificada	86
3.5.2	INMUNIZACIÓN DE UN CONEJO CON LA PROTEÍNA HIS-PADA	86
3.5.3	OPTIMIZACIÓN DEL SUERO ANTI-PADA	86
3.5.3.1	Sustracción del suero con extracto proteico de <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	87
3.5.3.2	Purificación del suero con la proteína PadA recombinante pura de <i>E.coli</i>	87
3.5.4	SÍNTESIS DE UN NUEVO ANTICUERPO CONTRA EL CARBOXILO TERMINAL DE PADA	87
3.5.5	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA (<i>WESTERN BLOT</i>)	88
3.5.5.1	Preparación de extractos proteicos de células y estructuras del desarrollo.	88
3.5.5.1.1	Extracto proteico total de <i>E.coli</i> BL21 DE3 pLysS	88
3.5.5.2	Cuantificación de los extractos de proteína	88
3.5.5.3	Electroforesis y transferencia de las proteínas	89
3.5.6	DETECCIÓN POR <i>WESTERN BLOT</i> DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL MEDIO EXTRACELULAR.	89
3.5.7	DETECCIÓN DE PADA POR INMUNOCITOQUÍMICA	90
3.6	CARACTERIZACIÓN DE LA AFINIDAD POR COFACTOR DE PADA Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE PROTEÍNAS <i>NmRA-LIKE</i> EN <i>D. DISCOIDEUM</i>	91
3.6.1	PURIFICACIÓN DE PADA PARA ESTUDIOS DE UNIÓN A COFACTOR	91
3.6.2	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS <i>NmRA-LIKE</i> EN <i>D. DISCOIDEUM</i>	91
3.7	ANÁLISIS POR MICROMATRICES DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>padA</i> EN MEDIO HL5 Y MEDIO MÍNIMO	92
3.7.1	PRINCIPIO DEL ANÁLISIS POR MICROMATRICES	92
3.7.2	PREPARACIÓN DE ARN PARA EL ANÁLISIS POR MICROMATRICES	92
3.7.3	SÍNTESIS DE ADNc MODIFICADO Y MARCAJE CON CY3 Y CY5	93
3.7.4	PRE-HIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS	95
3.7.5	ANÁLISIS DE LOS DATOS	95
3.8	TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE <i>D. DISCOIDEUM</i>	97
3.8.1	CRECIMIENTO	97
3.8.1.1	Crecimiento en medio sólido sobre césped de <i>K. aerogenes</i>	97
3.8.1.2	Crecimiento en medio axénico	97
3.8.1.2.1	Medios de cultivo	97
3.8.1.2.2	Contaje de células en crecimiento en medio axénico	98
3.8.2	TRANSFECCIÓN DE <i>DICTYOSTELIUM</i> POR ELECTROPORACIÓN	98
3.8.3	DESARROLLO DE <i>D. DISCOIDEUM</i>	99
3.8.3.1	Desarrollo sobre filtro de nitrocelulosa	99
3.8.3.2	Desarrollo sobre agar purificado	99
3.8.3.3	Desarrollo sobre filtros de teflón para hibridación <i>in situ</i>	99
3.8.3.4	Desarrollo (agregación) en condiciones sumergidas	100
3.8.4	OTRAS TÉCNICAS ESPECÍFICAS	101

3.8.4.1	Cuantificación del AMPc	101
3.8.4.1.1	Cuantificación del AMPc extracelular	101
3.8.4.1.2	Cuantificación del AMPc total a las 6 h de desarrollo	101
3.8.4.2	Ensayo de quimiotaxis sobre agar purificado	102
3.8.4.3	Ensayo de la actividad fosfodiesterasa	103
3.8.4.4	Detección de la actividad β -galactosidasa en estructuras de desarrollo	104
3.8.4.5	Hibridación <i>in situ</i> sobre estructuras del desarrollo	104
3.8.4.6	Ensayos de adhesión	106
3.8.4.6.1	Adhesión célula-célula durante el desarrollo temprano (0-8 horas)	106
3.8.4.6.2	Adhesión célula-célula dependiente de EDTA	106
3.8.4.6.3	Adhesión célula-célula durante el desarrollo tardío	107
3.8.4.6.4	Adhesión al sustrato durante el desarrollo temprano	107
3.8.4.7	Preparación de medios condicionados	107
4	RESULTADOS	109
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PADA	111
4.1.1	LA PROTEÍNA TRUNCADA PADAD276 ESTÁ AUSENTE EN EL MUTANTE <i>padA</i> ⁻	111
4.1.2	DETECCIÓN DE PADA POR INMUNOCITOQUÍMICA	112
4.1.3	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE PADA DURANTE EL DESARROLLO DE <i>D. DISCOIDEUM</i>	113
4.1.4	BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON PADA	114
4.1.5	PADA ES EL HOMÓLOGO DE NMRA EN <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	115
4.2	CRECIMIENTO VEGETATIVO	117
4.2.1	LA PROTEÍNA PADA NO ESTÁ REGULADA POR METABOLITO DE AMONIO	117
4.2.2	PADA ES NECESARIA PARA EL CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO	119
4.2.3	ANÁLISIS POR MICROMATRICES DE ADN DE LOS GENES REGULADOS POR PADA	121
4.2.3.1	Genes diferencialmente regulados en HL5 y MM en <i>padA</i> ⁻	122
4.2.3.2	Clasificación de los resultados de las micromatrices en categorías del <i>Gene Ontology</i>	123
4.2.3.2.1	GO de los genes regulados al alza	123
4.2.3.2.2	GO de los genes regulados a la baja	124
4.2.3.3	Clasificación de los resultados de las micromatrices en categorías del <i>Yeast ontology</i>	127
4.2.3.4	Genes comunes regulados en HL5 y MM	138
4.2.4	PADA Y LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS AZÚCARES	141
4.2.4.1	La adición de azúcares al medio mínimo no complementa el defecto en crecimiento de <i>padA</i> ⁻	141
4.2.4.2	El <i>Counting Factor</i> está ligeramente alterado en <i>padA</i> ⁻	143
4.2.5	LA TRANSICIÓN CRECIMIENTO-DESARROLLO (GDT) ESTÁ ALTERADA EN EL MUTANTE <i>padA</i> ⁻	143
4.3	DESARROLLO TEMPRANO: AGREGACIÓN	146
4.3.1	LAS CÉLULAS <i>padA</i> ⁻ FORMAN MENOS TERRITORIOS DE AGREGACIÓN Y DE MENOR TAMAÑO QUE EL TIPO SILVESTRE	146
4.3.2	PADA ES NECESARIA PARA ESTABLECER EL TAMAÑO CORRECTO DE LOS CENTROS DE AGREGACIÓN	147
4.3.3	LAS CÉLULAS <i>padA</i> ⁻ ESTÁN HOMOGÉNEAMENTE DISTRIBUIDAS EN LOS CENTROS DE AGREGACIÓN EN QUIMERAS CON CÉLULAS SILVESTRES	148

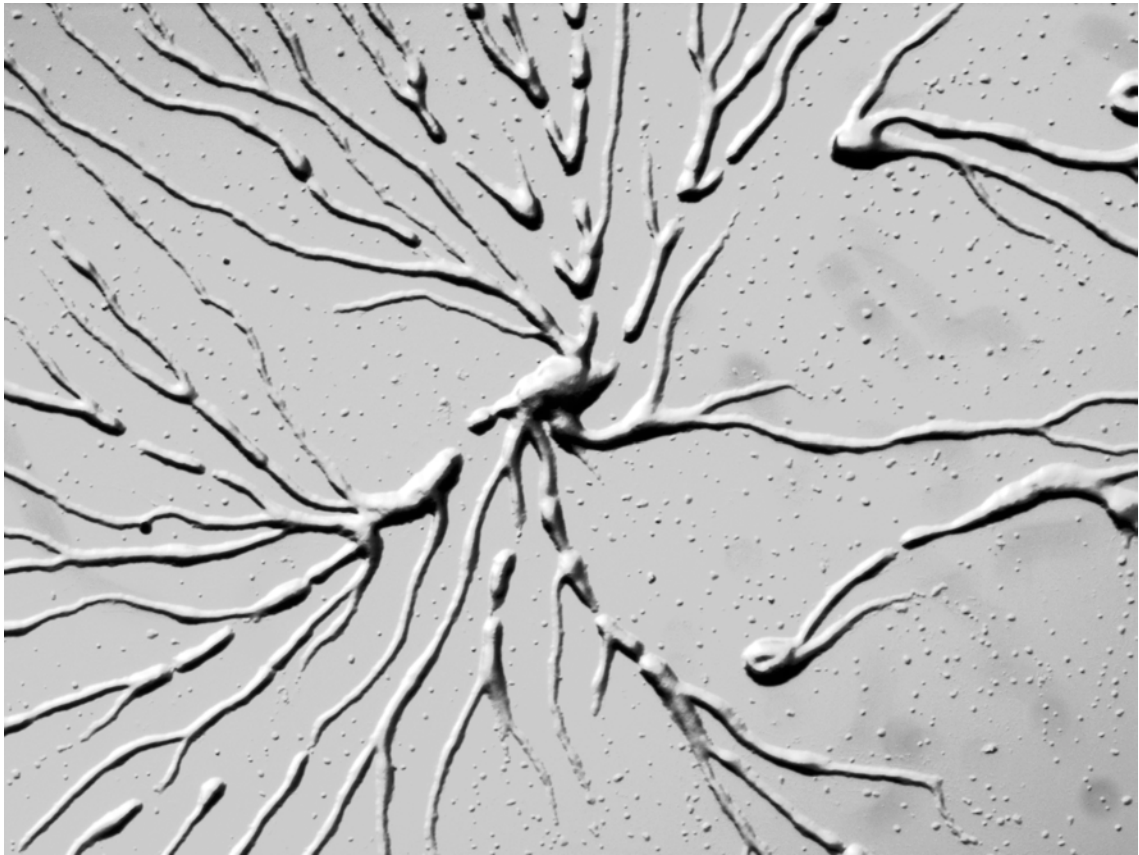
4.3.4	EL DEFECTO EN AGREGACIÓN DE LAS CÉLULAS <i>padA</i> ⁻ SE RESCATA CON ALTA DENSIDAD CELULAR	149
4.3.5	LA CAFÉINA FENOCOPIA EL DEFECTO EN AGREGACIÓN DE <i>padA</i> ⁻ EN EL TIPO SILVESTRE	151
4.3.6	LA ADICIÓN DE AMPC O 8-BROMO-AMPC NO RESCATA EL FENOTIPO DE AGREGACIÓN	152
4.3.7	EL MEDIO CONDICIONADO DE <i>padA</i> ⁻ IMPIDE LA CORRECTA AGREGACIÓN EN EL TIPO SILVESTRE	153
4.3.8	LA AGREGACIÓN EN <i>padA</i> ⁻ ES MÁS SENSIBLE A LA INHIBICIÓN PARCIAL DE PdiA, INHIBIDOR DE LA FOSFODIESTERASA EXTRACELULAR	155
4.3.9	LAS CÉLULAS <i>padA</i> ⁻ TIENEN UNA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA EXTRACELULAR MENOR QUE LA DEL TIPO SILVESTRE	158
4.3.10	LAS CÉLULAS <i>padA</i> ⁻ RESPONDEN A UN RANGO DE AMPC MÁS ESTRECHO QUE EL TIPO SILVESTRE A TRAVÉS DE STREAMS ENGROSADOS Y CORTOS	162
4.3.11	LAS CÉLULAS <i>padA</i> ⁻ PRODUCEN TANTO AMPC EXTRACELULAR COMO EL TIPO SILVESTRE	165
4.3.12	LA ADHESIÓN CELULAR DURANTE EL DESARROLLO ESTÁ AFECTADA EN EL MUTANTE <i>padA</i> ⁻	166
4.3.12.1	La adhesión célula-célula sensible al EDTA está ligeramente afectada en <i>padA</i> ⁻	166
4.3.12.2	La adhesión célula-célula está comprometida en el desarrollo temprano de <i>padA</i> ⁻	167
4.3.12.3	La transcripción de genes de adhesión está regulada a la baja en <i>padA</i> ⁻	169
4.3.13	LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SEÑALIZACIÓN DEL AMPC ESTÁ REGULADA A LA BAJA EN <i>padA</i> ⁻	172
4.3.14	EXPRESIÓN ESPACIAL DE <i>acaA</i> Y <i>pdsA</i> EN ESTRUCTURAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO	175
4.3.15	REGULACIÓN DE LOS PROMOTORES ESPECÍFICOS DE LA AGREGACIÓN DE <i>acaA</i> , <i>pdsA</i> Y <i>carA</i> EN EL MUTANTE <i>padA</i> ⁻	176
4.3.15.1	Análisis transcripcional del promotor 1 de <i>acaA</i> en <i>padA</i> ⁻	177
4.3.15.2	Análisis transcripcional de los promotores tempranos de <i>carA</i> y <i>pdsA</i> en <i>padA</i> ⁻	178
4.3.16	LA GENERACIÓN ARTIFICIAL DE PULSOS PERIÓDICOS DE AMPC NO RESTAURA EL DEFECTO EN AGREGACIÓN DE <i>padA</i> ⁻	179
4.3.16.1	Morfología celular y desarrollo	180
4.3.16.2	Los pulsos de AMPC no restauran la expresión de <i>acaA</i> , <i>carA</i> , <i>pdsA</i> y <i>pdiA</i> a niveles silvestres en <i>padA</i> ⁻	182
4.3.16.3	El tratamiento con pulsos de AMPC no induce translocación nuclear de la proteína PadA	184
4.3.17	LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR GMPC NO ESTÁ ALTERADA EN <i>padA</i> ⁻	185
4.3.18	LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE <i>carA</i> RESCATA EL FENOTIPO EN AGREGACIÓN DE <i>padA</i> ⁻	186
4.3.18.1	La expresión constitutiva de <i>carA</i> rescata el número y el tamaño de los territorios en <i>padA</i> ⁻	186
4.3.18.2	La actividad fosfodiesterasa en <i>padA</i> ⁻ /A15:: <i>carA</i> está parcialmente rescatada	188
4.3.18.3	Análisis transcripcional en <i>padA</i> ⁻ /A15:: <i>carA</i>	190
4.3.19	LA ACTIVIDAD PROMOTORA <i>acaA</i> Y <i>pdsA</i> (TARDÍO) ESTÁ DESREGULADA EN LOS SLUGS DE <i>padA</i> ⁻	192
4.4	VALIDACIÓN DEL MODELO ESTRUCTURAL DE PadA	193
4.4.1	LAS PROTEÍNAS MUTANTES PadAH178A/D179N Y PadAT18V SE EXPRESAN EN EL FONDO <i>padA</i> ⁻	193

4.4.2	<i>padA</i> ·/A15:: <i>padAT18V</i> y <i>padA</i> ·/A15:: <i>padAH178A/D179N</i> NO RESCATAN EL DEFECTO EN CRECIMIENTO DE <i>padA</i> ·	194
4.4.3	LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PadAH178A/D179N Y PadAT18V NO RESTAURA EL DEFECTO DE <i>padA</i> · DURANTE LA AGREGACIÓN NI LA CULMINACIÓN	195
5	DISCUSIÓN	199
5.1	PadA REGULA EL TAMAÑO DEL TERRITORIO EN <i>D. DISCOIDEUM</i> A TRAVÉS DEL RELÉ EXTRACELULAR DEL AMPc	201
5.2	EL RECEPTOR DEL AMPc, CARA, ES LIMITANTE DURANTE LA AGREGACIÓN Y LA CULMINACIÓN DE <i>padA</i>·	203
5.3	UN POSIBLE PAPEL DE PadA EN EL CONTROL DE LA TRANSICIÓN GDT	205
5.4	PadA COMO POSIBLE INTEGRADOR DE DIFERENTES RUTAS METABÓLICAS	206
5.5	VALIDACIÓN DEL MODELO ESTRUCTURAL PROPUESTO PARA PadA	207
5.6	MODELO PROPUESTO	208
6	CONCLUSIONES	211
7	BIBLIOGRAFÍA	215

ABREVIATURAS

AcaA	del inglés, <i>Adenylate Cyclase of Aggregation stage</i>
ALC	del inglés, <i>Anterior Like Cells</i>
AMPC	del inglés, <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
AS	del inglés, <i>Arginine Succinate Synthase</i>
AX2	del inglés, <i>Axenicly grown strain 2</i>
BSA	del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAM	del inglés, <i>Cell Adhesion Molecule</i>
CarA	del inglés, <i>cAMP receptor A</i>
CF	del inglés, <i>Counting Factor</i>
CMF	del inglés, <i>Conditioned Medium Factor</i>
CMFR1	del inglés, <i>Conditioned Medium Factor Receptor 1</i>
CRTF	del inglés, <i>CarA Transcription Factor</i>
DAPI	del inglés, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DIF-1	del inglés, <i>Differentiation Inducing Factor</i>
DMSO	del inglés, <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DTT	del inglés, <i>Dithiothreitol</i>
EDTA	del inglés, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Erk2	del inglés, <i>Extracellular Regulated Kinase</i>
EST	del inglés, <i>Expression Secuence Tag</i>
GC	del inglés, <i>Guanylate cyclase</i>
GDT	del inglés, <i>Growth-Development Transition</i>
GFP	del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GO	del inglés, <i>Gene Ontology</i>
GOAT	del inglés, <i>Gene Ontology Analysis Tool</i>
GMPc	del inglés, <i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
GPCR	del inglés, <i>G-protein coupled receptor</i>
HL5	Medio de cultivo completo

IPTG	del inglés, <i>Isopropyl-beta-thiogalactopyranoside</i>
NF-κB	del inglés, <i>Nuclear Factor κB</i>
NO	del inglés, <i>Nitric oxide</i>
RegA	del inglés, <i>Response regulator receiver domain-containing protein</i>
PadA	del inglés, <i>Prestalk A Differentiation A</i>
PdsA	del inglés, <i>cAMP phosphodiesterase</i>
PdiA	del inglés, <i>Phosphodiesterase Inhibitor</i>
PH	del inglés, <i>Pleckstrin Homology domain</i>
PIP3	del inglés, <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PIP2	del inglés, <i>Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate</i>
PI3K	del inglés, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	del inglés, <i>Protein Kinase A</i>
PKB	del inglés, <i>Protein Kinase B</i>
PSF	del inglés, <i>Pre-Starvation Factor</i>
pst	del inglés, <i>Pre-stalk cells</i>
RFP	del inglés, <i>Red Fluorescent Protein</i>
SDS	del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
MM	del inglés, <i>Minimal medium</i> (Medio mínimo)
MTF	del inglés, <i>Metabolic Transcription Factors</i>
NMRAL1	del inglés, human NmrA-like 1
SDR	del inglés, <i>Short Chain Dehydrogenase/Reductase</i>
X-gal	del inglés, <i>5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>



1 Introducción

1.1 GENERALIDADES, APUNTES HISTÓRICOS Y FILOGENIA

Dictyostelium discoideum es una ameba eucariota, haploide, y de un tamaño de 10-20 micras. Su hábitat es el suelo, donde vive alimentándose de bacterias y levaduras a las que fagocita. Se encuentra en la frontera entre lo unicelular y lo pluricelular, dado que presenta un ciclo de vida como ameba en presencia de nutrientes y una fase multicelular cuando carece de éstos. El ayuno desencadena, como mecanismo de supervivencia, la agregación de las amebas, que, tras procesos de diferenciación celular, expresión diferencial de genes y movimientos morfogenéticos, darán lugar al cuerpo fructífero, encargado de la dispersión de las esporas. Esta ameba se encuentra en diferentes latitudes, siempre dentro de un rango de temperatura cercano a los 22°C (revisado en Kessin, 2001; Escalante y Vicente, 2000).

La primera descripción de un dictiostélido data del año 1869, cuando el micólogo Oskar Brefeld identificó individuos de *D. mucoroides* sobre estiércol de caballo y dio nombre al género *Dictyostelium*. *Dicty* = "net like", por la agregación en forma de red de las amebas, y *stelium* = "torre" por la forma del cuerpo fructífero (Brefeld, 1869) (Fig. 1). Fue catalogado como hongo y, durante años, no se contempló la fagocitosis como modo de alimentación, sino que se creía que las amebas secretaban enzimas digestivos al medio extracelular, como los hongos (Vuillemin, 1903). En 1935, K.B. Raper aisló por primera vez un ejemplar de *D. discoideum* en los bosques de Ashville, Carolina del Norte (EE.UU.), y estableció las bases para el estudio de este organismo (Raper, 1935). Realizó elegantes experimentos donde consiguió cultivar las amebas vegetativamente sobre un césped de bacterias y caracterizó su morfología. Watts y Ashworth (1970) consiguieron una cepa derivada de un aislado natural que podía crecer vegetativamente en un medio líquido axénico: AX2 (*Axenically grown strain-2*). La capacidad de crecer en medio definido estaba originada por mutaciones naturales en *loci* identificados (Watts y Ashworth, 1970).

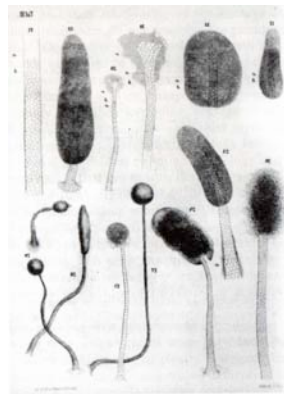


Figura 1. Primera ilustración de un dictiostélido: *Dictyostelium mucoroides*. Realizada por O. Brefeld en 1869 (Brefeld, 1869).

D. discoideum, siguiendo los postulados morfológicos de la taxonomía clásica, se clasificaba en el *phylum* de los hongos, pero la aparición de las técnicas moleculares permitió clasificarlo dentro del supergrupo *Amoebozoa*, independiente de *Fungi* y *Metazoa*, y dando lugar a un nuevo grupo monofilético, *Mycetozoa*. Aunque había evidencias anteriores (Baldauf *et al.*, 1997, Baptiste *et al.*, 2002), fue la secuenciación completa del genoma en el año 2005 (Eichinger *et al.*, 2005) lo que permitió establecer que los dictiostélidos se separaron del tronco común de los eucariotas después de la divergencia de las plantas y antes de la de hongos-animales. Esta clasificación filogenética se realizó en base a la comparación de 5279 proteínas ortólogas entre los proteomas de los eucariotas representados en la Figura 2.

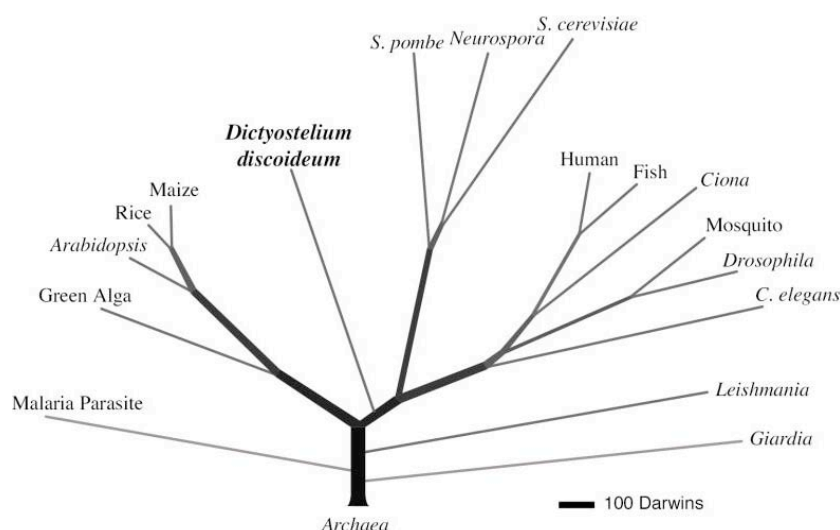


Figura 2. Filogenia de los eucariotas basada en la comparación del proteoma de las 17 especies que figuran en el cladograma. La distancia evolutiva se representa en Darwins (Eichinger *et al.*, 2005).

1.2 GENOMA Y PROTEOMA

La secuenciación de su genoma en el año 2005 (Eichinger *et al.*, 2005) reveló que tiene un tamaño de 34 Mb y se estima que codifica 12500 genes distribuidos en 6 cromosomas. Es compacto, con pocos intrones y regiones intergénicas cortas (2,5 kb frente a 128 kb en humanos), donde el 62% del genoma codifica proteínas. Se caracteriza por su alto contenido en A+T, aproximadamente el 77,6%, que puede llegar al 90% en zonas no codificantes, lo que dificultó el proceso de secuenciación. El genoma mitocondrial (mtDNA) está compuesto por ADN circular de doble cadena de 56 kb, más extenso que el de humanos, con 17 kb. Los genes codificados por este genoma se transcriben en un único transcrito primario que después madura. Tanto el genoma nuclear como el mitocondrial se rigen por el código universal, a pesar de su alto contenido en A+T (revisado en Barth *et al.*, 2007).

El análisis comparativo del proteoma de 12 organismos representativos de metazoos, plantas y hongos totalmente secuenciados, revela tanto dominios proteicos funcionales comunes como únicos de cada grupo que comparten con *D. discoideum*. Los dominios de proteínas de *D. discoideum* que previamente sólo se habían descrito en *metazoa* tienen una especial relevancia por su aportación al entendimiento de procesos complejos de los eucariotas superiores. Entre ellos, destacan numerosos dominios ortólogos de proteínas implicadas en enfermedades humanas, más numerosos que en la levadura y algunos de ellos ausentes en *S. cerevisiae* o *S. pombe* (Eichinger *et al.*, 2005; revisado en Urushihara, 2009; Williams *et al.*, 2006). Torija y colaboradores (2006) identificaron 41 genes presentes en *Dictyostelium* y humanos pero ausentes en la levadura, entre ellos, dos se han implicado en enfermedades humanas: *midA* en enfermedades mitocondriales y *vmpA* en pancreatitis y cáncer (Torija *et al.*, 2006a; 2006b; Carilla-Latorre *et al.*, 2010; Calvo-Garrido *et al.*, 2008). Destaca el elevado número de proteínas implicadas en el control del citoesqueleto durante la motilidad celular y su similitud en número y tipo con las humanas (Eichinger *et al.*, 2005; Carnell e Insall, 2011), lo que lo convierte en un excelente modelo de movimiento de neutrófilos (Parent, 2004). Como organismo multicelular, su proteoma también revela un importante número de dominios implicados en señalización celular, comunicación intercelular y adhesión, muchos de ellos presentes únicamente en *metazoa*. Entre otras, destacan los 55 receptores acoplados a proteína G (GPCR), esenciales en acoplar las señales externas con la señalización celular, la mayoría englobadas en la familia de las secretinas, Glutamato/GABA o *frizzled/smoothened* (Fountain, 2009; Eichinger *et al.*, 2005). Relacionadas con las GPCR, se han descrito 14 subunidades $G\alpha$, 2 $G\beta$ y una única $G\gamma$. También se han descrito factores de transcripción de la familia STAT que en mamíferos median la respuesta a citocinas y a factores de crecimiento (Eichinger *et al.*, 2005; Kawata, 2011), además

de Gsk3, homólogo de GskA de mamíferos y esencial en diferenciación celular, o las rutas PTEN/PI3K y Akt/PKB, esenciales para la correcta quimiotaxis y polarización (Schilde *et al.*, 2004; Willard y Devreotes, 2006; Meili *et al.*, 1999). En el contexto ecológico, destaca el elevado número de poliquetido sintasas (43 putativas), implicadas en la síntesis de antibióticos y metabolitos secundarios, o la riqueza de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) (66), responsables de funciones detoxificadoras (Eichinger *et al.*, 2005).

1.3 ORGANISMO MODELO

D. discoideum es un excelente organismo modelo que crece de manera rápida (tiempo de duplicación de ≈ 9 h), sencilla y económica en el laboratorio. Su ciclo de desarrollo dura 24 horas y es sencillo pero con una organización básica similar a la de metazoos. Es haploide, lo que permite la visualización de los fenotipos mutantes, y la separación entre sus dos ciclos de vida, permite el aislamiento de mutantes de desarrollo. Todas las técnicas de biología molecular y genética reversa son aplicables a *Dictyostelium*. Es posible generar fácilmente mutantes por recombinación homóloga; baterías de mutantes por REMI (*Restriction Enzyme Mediated Integration*) (Kuspa y Loomis, 1992); y la delección de múltiples genes con el sistema Cre-loxP (Faix *et al.*, 2004). Las estructuras del desarrollo son transparentes, de manera que se puede seguir la trayectoria de células marcadas con proteínas fluorescentes. A pesar de la simplicidad de su ciclo de desarrollo existen diferentes tipos celulares, que a su vez se dividen en subtipos. Los dos tipos fundamentales son las células del tallo (se mueren y están cubiertas por una capa de celulosa) y las esporas, que sobreviven. Recientemente, se han escrito las células centinela, que fagocitan bacterias y secuestran toxinas dando lugar a un “sistema inmune” primitivo (Chen *et al.*, 2007).

Debido a la conservación de los procesos y de las proteínas implicadas en los mismos, *Dictyostelium* es un excelente modelo para analizar procesos básicos de quimiotaxis, citoquinesis, fagocitosis, tráfico de vesículas, autofagia, motilidad y migración celular, señalización intracelular, diferenciación celular y desarrollo, competencia celular, etc. (King e Insall, 2009; Wang *et al.*, 2011; Carnell e Insall, 2011; Cosson y Soldati, 2008; Rivero, 2008; Calvo-Garrido *et al.*, 2010; Weijer *et al.*, 2009; Kay y Thompson, 2009; Jang y Gomer, 2011; Chattwood y Thompson, 2011; Shaulsky y Kessin, 2007). Pero es su uso como modelo de enfermedades humanas lo que está en auge (revisado en Williams *et al.*, 2006; Escalante, 2011). El instituto nacional de salud de Estados Unidos lo incluye entre los 8 sistemas modelo no mamíferos para el estudio de procesos moleculares de importancia médica (<http://www.nih.gov/science/models/>). El trabajo con *D. discoideum* permitió el

establecimiento de las bases moleculares de la acción del litio, y del ácido valproico, en el tratamiento del trastorno bipolar afectivo y otros trastornos del ánimo (Williams *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2011; revisado en Williams *et al.*, 2002). También contribuyó a la identificación de nuevos genes y rutas implicadas en la resistencia al cisplatino, como el metabolismo de los esfingolípidos (revisado en Alexander y Alexander, 2011). Más recientemente se está empleando en identificar las bases moleculares del síndrome de *Shwachman-Diamond* (Wong *et al.*, 2011), la lisencefalia (revisado en Meyer *et al.*, 2011) o las enfermedades mitocondriales (revisado en Francione y Fischer, 2011), ya que las proteínas causantes de estas enfermedades están conservadas. También se ha extendido su uso como modelo de patógenos intracelulares, como *Legionella pneumoniae* que en humanos es fagocitada por los macrófagos alveolares (Hägele *et al.*, 2000; revisado en Bozzaro y Eichinger, 2011).

1.4 CICLO DE VIDA

1.4.1 Fase vegetativa. Estadío unicelular

En su hábitat natural, las amebas se dividen por mitosis y se alimentan de diversas especies de bacterias y levaduras, por fagocitosis. Este proceso, similar al ejecutado por macrófagos y neutrófilos, hace que se considere a *D. discoideum* un fagocito profesional y se postula que la fagocitosis ha derivado de una función alimenticia en *D. discoideum* a un mecanismo de defensa en vertebrados (Desjardins *et al.*, 2005). Las amebas detectan el alimento por el ácido fólico emitido por las bacterias, que actúa como un quimioatrayente y a cuyo gradiente responden. En cultivos líquidos axénicos, las amebas adquieren los nutrientes por pinocitosis y macropinocitosis, englobando grandes volúmenes de medio de manera inespecífica (Watts y Ashworth, 1970; Cardelli, 2001).

Las células responden eficientemente a dos gradientes de quimioatrayentes a lo largo de todo su ciclo de vida; el ácido fólico durante el crecimiento y el AMPc durante todo el ciclo del desarrollo, y son capaces de detectar diferencias de únicamente el 2% entre la parte anterior y posterior de la célula (Varnum *et al.*, 1984). Además de la quimiotaxis, la regulación de la dinámica del citoesqueleto es necesaria para la fagocitosis y la citoquinesis, lo que justifica que 179 genes (1,4%) contribuyan al citoesqueleto de actina. La variedad y alta redundancia de estas proteínas es esencial para sobrellevar las duras condiciones de vida de las amebas fuera del laboratorio (revisado en Williams *et al.*, 2005). La alta similitud de los procesos de quimiotaxis y dinámica del citoesqueleto con los de organismos superiores hace de *D. discoideum* un excelente modelo para el estudio de las bases moleculares de los mismos (revisado en Van Haastert y Devreotes, 2004; Carnell e Insall, 2011).

1.4.2 Fase multicelular

El suelo es un entorno hostil, sometido a imprevisibles fluctuaciones en la disponibilidad de alimentos, y para evitar el fatal desenlace de una muerte por inanición, *D. discoideum* ha desarrollado un mecanismo de defensa basado en el asociacionismo y la formación de un cuerpo multicelular.

En ausencia de nutrientes, *D. discoideum* es capaz de llevar a cabo un ciclo de desarrollo que incluye la comunicación y coordinación de $\approx 1 \times 10^5$ células y que culmina en la formación de una estructura multicelular de supervivencia. A diferencia de otros organismos, la multicelularidad no se alcanza por división celular, sino por agregación de células individuales, que viven de manera independiente hasta la depleción de nutrientes. La fase pluricelular implica la coordinación de quimiotaxis, diferenciación celular, movimientos morfogenéticos, y muerte celular que culmina a las 24 horas con la formación de un cuerpo fructífero. Este cuerpo fructífero consta, mayoritariamente, de dos tipos celulares: esporas y células tallo; las esporas están elevadas del sustrato por el tallo, formado por células muertas. Esta fase multicelular es la más estudiada en el laboratorio, aunque no es la única forma de resistencia, ya que también pueden formarse macrocistos en condiciones muy concretas, como consecuencia de un desarrollo sexual (Bloomfield *et al.*, 2010, 2011; O'Day y Keszei, 2011). La reproducción sexual en este organismo es compleja e incluye procesos de gametogénesis, fusión nuclear, diferenciación de un cigoto gigante, canibalismo y meiosis. Sin embargo la meiosis no es reproducible en el laboratorio, por lo que la reproducción sexual no es un proceso de fácil estudio/manejo en este organismo (Wallace y Raper, 1979).

1.4.2.1 Detección de ausencia de nutrientes y agregación

La entrada en el desarrollo está altamente regulada, y las células comienzan a prepararse para el ayuno antes de que acontezca. En la naturaleza, a diferencia del laboratorio donde el ayuno se induce de manera repentina retirando el medio de cultivo, la depleción de nutrientes es gradual y las células entran en un proceso de transición crecimiento-desarrollo. Las células secretan factores autocrinos (PSF, CMF) que les permiten detectar el tamaño poblacional respecto a la disponibilidad de nutrientes, y también comprobar si el número de células es suficiente para la formación de un cuerpo fructífero. Estos factores inducen la expresión de genes esenciales para la entrada en el desarrollo: los componentes de la señalización del AMPc, y las proteínas de adhesión, entre otros, y originan el silenciamiento de los genes de crecimiento (Clarke y Gomer, 1995; Yuen *et al.*, 1995; Van Haastert *et al.*, 1996; Gomer *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2011).

Las amebas, al detectar la ausencia de alimento, sintetizan y secretan AMP cíclico al medio. El gradiente del morfógeno, que es emitido en pulsos con un periodo de 6 min, es detectado por las amebas del entorno que responden polarizándose y orientándose hacia la fuente de AMP cíclico, que se convertirá en el centro de agregación. Las amebas polarizadas migran hacia este punto de encuentro secretando a su vez AMP cíclico, amplificando así la señal. El resultado de este proceso es la formación de un agregado celular de aproximadamente 1×10^5 células que se compacta, cubriéndose de una capa de polisacáridos y de celulosa, secretada por ellas mismas para formar el *mound* o montaña (esta estructura, y todas las posteriores que se describen a continuación, se pueden observar en la Figura 3)(Kessin, 2001; Weijer, 2004; Strmecki *et al.*, 2005; Escalante y Vicente, 2000). La desdiferenciación es un proceso regulado en *D. discoideum* (Katoh *et al.*, 2004), y hasta las 4-6 horas del desarrollo, las células pueden dar marcha atrás y volver al estado vegetativo si se les suministra alimento, pero una vez sobrepasado el punto de no retorno, las amebas adquieren un compromiso para culminar y la desdiferenciación ya no es posible (Katoh *et al.*, 2007). Este punto de inflexión está regulado por el AMPc que anula la capacidad fagocítica de las células (Katoh *et al.*, 2007). Esta plasticidad en el desarrollo se asemeja al desarrollo embrionario de los mamíferos, que se mantiene indiferenciado hasta estadios tardíos. Sin embargo otros sistemas modelo como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster* muestran una plasticidad muy restringida después de las primeras divisiones (revisado en Strmecki *et al.*, 2005).

1.4.2.2 Desarrollo terminal

Las células, inicialmente idénticas, comienzan a expresar marcadores específicos desde el inicio de la agregación. Las células precursoras de las esporas (pre-espora) y las de las células tallo (pre-tallo) se distribuyen de forma dispersa en el *mound* (Early *et al.*, 1995). Las células pre-tallo, mediante movimientos diferenciales, migran hacia la zona más apical y un subgrupo de estas células forma el *tip* u organizador que, como en los metazoos, es una fuente de señales durante todo el proceso del desarrollo. El *tip* se elonga hacia arriba formando una estructura, *first finger* que, dependiendo de las condiciones del entorno, puede dar lugar a una babosa (*slug*) con capacidad migratoria, fototaxis y termotaxis. La babosa migra mediante un movimiento coordinado de las células sobre la matriz mucopolisacáridica que la cubre hasta encontrar las condiciones óptimas de temperatura, pH y humedad para la culminación. Las células pre-tallo situadas en la parte más anterior de la babosa atraviesan la masa de células pre-espora para contactar con el sustrato y comenzar la formación de la estructura terminal (estadio *mexican hat*). A continuación, la población pre-tallo forma un tallo perfectamente definido (culminante temprano) para que la masa de esporas ascienda. Las esporas, una vez

maduras, se dispersan con la ayuda del viento u otros seres vivos, como los nematodos, y germinan donde las condiciones sean más favorables dando lugar a un nuevo ciclo (Fig. 3).

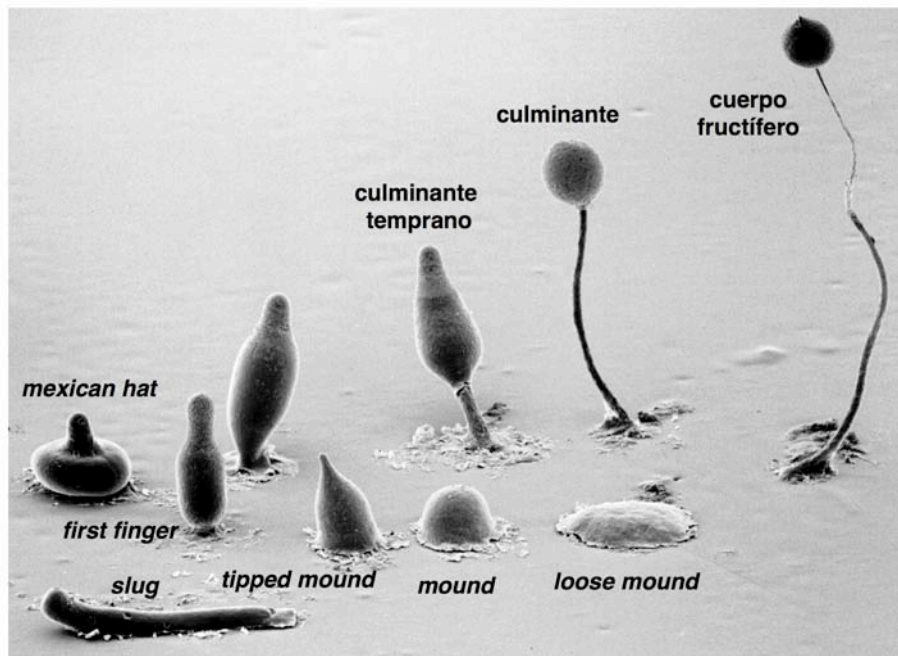


Figura 3. Ciclo de desarrollo asexual de *D. discoideum*. La imagen fue tomada mediante microscopía electrónica de barrido en *Texas Tech University* por R. Lawrence Blaton y Mark Grimson.

1.4.3 Diferenciación celular

La diferenciación celular tiene lugar a lo largo de la fase multicelular de su ciclo de vida. Las esporas estarán representadas en la siguiente generación, pero, el destino final de las células tallo es la muerte celular programada. Son células vacuoladas, cubiertas de celulosa, que forman el tallo y el disco basal, responsable del anclaje al sustrato del cuerpo fructífero (revisado en Strmecki *et al.*, 2005; Golstein *et al.*, 2003; Luciani *et al.*, 2008).

Como consecuencia de un controlado programa morfogenético, ambos precursores celulares, que se encontraban dispersos en el *mound*, establecen un patrón anteroposterior de desarrollo en el *slug*, donde los precursores del tallo ocupan el 20% anterior de la babosa y las células pre-espora, el 80% posterior (Raper, 1940; Williams, 2006).

Esta proporción se mantiene constante, independientemente del número total de células que constituyen el agregado. Los precursores de las células del tallo, se subdividen en diferentes poblaciones a lo largo del desarrollo. Las subpoblaciones denominadas “pstA”, “pstAB”, “pstO” y “pstB” se definen clásicamente en función de la expresión de las regiones promotoras de dos

genes: *ecmA* y *ecmB* (*extracellular matrix protein A* y *B*) (Jermyn *et al.*, 1989; Williams, 2006). Su distribución en el *slug* se representa en la Figura 4 y su posición a lo largo de todo el ciclo del desarrollo está reflejada en la Figura 5.

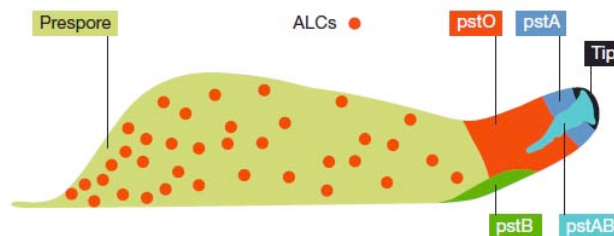


Figura 4. Distribución y organización de los subtipos celulares en el *slug*. Se representa en mostaza la población pre-espore, que abarca el 80% posterior de la babosa. En rojo, las células pre-tallo “pstO” y las “ALC”, dispersas en la masa de células pre-espore. En azul oscuro, la población pre-tallo “pstA” y, dentro de la misma, en negro, la región organizadora o *tip*. En azul claro, formando un cono, la población “pstAB” (Williams, 2006).

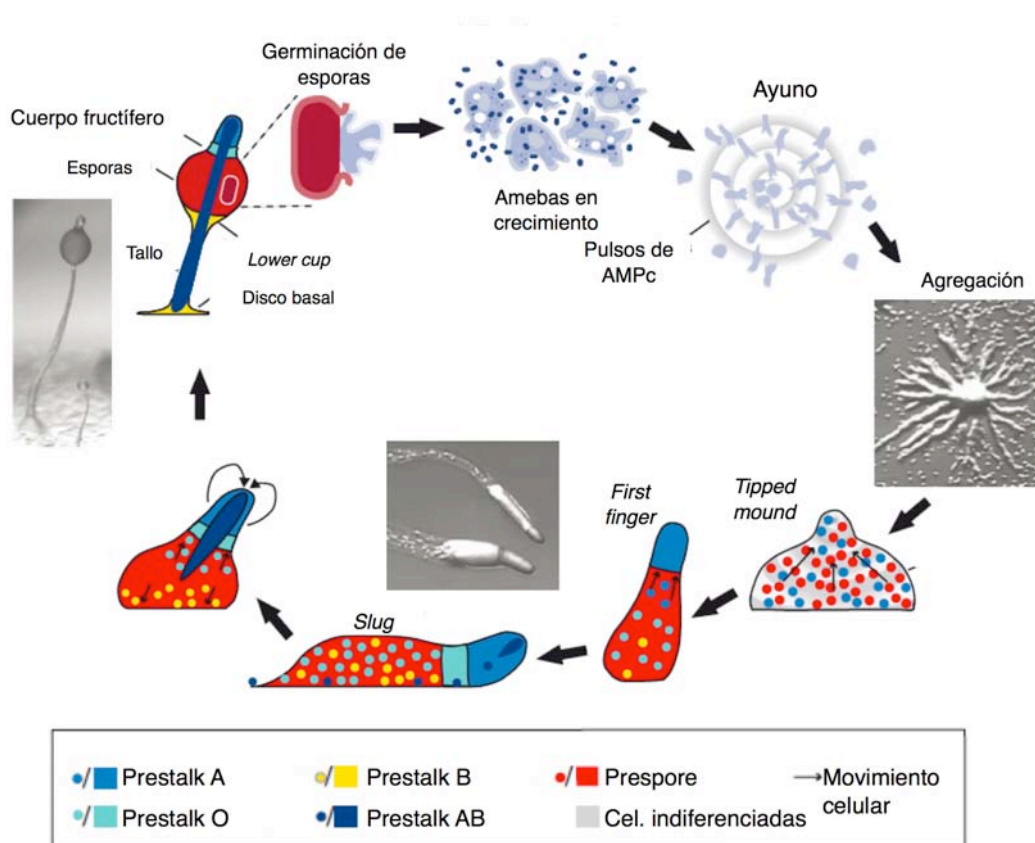


Figura 5. Esquema del ciclo de desarrollo de *D. discoideum* y la posición de los subtipos celulares a lo largo del mismo. Se marcan las distintas poblaciones en código de colores para que se aprecien los movimientos morfogenéticos que acontecen a lo largo del desarrollo y su destino final (modificado de Schaap, 2011a).

Actualmente, gracias a los datos obtenidos de micromatrices e hibridaciones *in situ* (Maeda *et al.*, 2003; Maruo *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2005), se sabe que estas poblaciones son en realidad mucho más complejas y albergan subgrupos heterogéneos de células que expresan genes de manera diferencial, como las células PstU (Yamada *et al.*, 2010). Existen, además, otros marcadores de la región pre-tallo (anticuerpo anti-CP-2) o pre-espora (anti-SP70) que no solapan totalmente con las anteriormente definidas (Gomer *et al.*, 1986).

1.4.3.1 Factores que inducen la diferenciación celular

Los primeros indicios de diferenciación celular tienen lugar en estadios muy tempranos del desarrollo en *D. discoideum*, y el mecanismo por el que la simetría inicial de una población clonal desaparece, ha sido intenso objeto de debate.

Previamente a la existencia de gradientes de morfógenos, las células muestran una predisposición reversible a un destino celular u otro desde la fase vegetativa, que viene marcada por diferentes factores (revisado en Jang y Gomer, 2011). La fase del ciclo celular (Weijer, 1984; Araki *et al.*, 1994) o la cantidad de energía almacenada (Leach *et al.*, 1973) por las células cuando se detectan las primeras señales de ayuno influyen en su destino de muerte (tallos) o supervivencia (espora) (Shaulsky y Kessin, 2007; Gomer y Jang, 2011). Si la célula está en fase S, M o G2 temprana al entrar en ayuno (la fase G1 es indetectable en este organismo), mostrará predisposición a un destino pre-tallo; si está en G2 tardía, a pre-espora. En mezclas de células, las que hayan crecido en presencia de glucosa tenderán a formar esporas frente a las que lo hayan hecho sin ella (revisado en Maeda, 2005). Estos parámetros podrían actuar confiriendo mayor o menor sensibilidad hacia los morfógenos presentes durante la fase multicelular.

El AMP cíclico es capital durante todo el desarrollo de *D. discoideum*, e induce la diferenciación de células pre-espora, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de la proteína quinasa GskA (revisado en Strmecki *et al.*, 2005), aunque sin su presencia tampoco se diferencian las células pre-tallo (Berks y Kay, 1988). Además de dirigir la agregación, el AMPc tiene un papel crucial en la culminación, donde es secretado de forma localizada por el *tip* para activar la PKA (Thomason *et al.*, 1999), evento imprescindible para la diferenciación terminal (Harwood *et al.*, 1992; revisado en Williams, 2006). El amonio y la adenosina (Theibert y Devreotes, 1984) actúan como antagonistas de la señalización del AMP cíclico en la culminación (Schindler y Sussman, 1977).

Otro morfógeno esencial para la formación de las células tallo es DIF-1 (*differentiation inducing factor 1*) (revisado en Kay *et al.*, 1999). Se trata de una alquil-fenona clorada secretada por las células pre-espora (Kay y Thompson, 2001), capaz de inducir la diferenciación de las células pre-tallo e inhibir la diferenciación de las pre-espora tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, se ha demostrado que DIF-1 no es esencial para la diferenciación de todos los subtipos de células pre-tallo, lo que sugiere que deben existir otras señales que interaccionen y controlen la diferenciación de estas células (Thompson y Kay, 2000; Maeda *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2005).

El proceso de diferenciación y maduración de las esporas es complejo, ya que deben de ser lo suficientemente resistentes como para soportar estrés térmico, osmótico, hídrico y resistir los ácidos del tracto digestivo de los organismos que las ingieren. El incremento de AMPc y la activación de la PKA (proteína quinasa A dependiente de AMPc) son también esenciales para el encapsulamiento de las esporas (Virdy *et al.*, 1999), pero otros factores, como el factor de transcripción SrfA (Escalante y Sastre, 1998), los péptidos SDF-1 y SDF-2 (Anjard *et al.*, 1998), entre otros, son también necesarios.

1.5 LA TRANSICIÓN CRECIMIENTO-DESARROLLO (GDT: *Growth-Development Transition*)

El crecimiento y la diferenciación celular son eventos mutuamente excluyentes, y en *D. discoideum*, el crecimiento y el desarrollo también lo son. La transición crecimiento-desarrollo (GDT) es crucial en el ciclo de vida, ya que implica pasar de una forma unicelular a una multicelular. Este punto de inflexión requiere, en esencia, el silenciamiento de genes del crecimiento y la expresión de genes pre-agregativos y del desarrollo temprano, como la maquinaria de señalización del AMPc o las proteínas de adhesión. Algunas proteínas encargadas de regular este complejo proceso comienzan a secretarse, como factores autocrinos, durante el crecimiento vegetativo (PSF) o con la depleción total de nutrientes (CMF). Su concentración aumenta de manera proporcional a la densidad celular y monitorizan el tamaño poblacional sin necesidad de que exista contacto célula-célula (Clarke y Gomer, 1995; Gomer *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2011).

1.5.1 PSF y YakA

La glicoproteína PSF (*Pre-Starvation Factor*), es uno de los primeros factores autocrinos secretados durante la transición (Clarke *et al.*, 1988; Burdine y Clarke, 1995). La cantidad de PSF presente en un momento dado es indicador de la relación entre células/nutrientes, ya que

la actividad de PSF se inhibe en presencia de bacterias, a través de un mecanismo no bien identificado (Blusch *et al.*, 1992). PSF prepara a las células para el desarrollo induciendo la expresión de genes como la discoidina I (*dscA*) (Clarke *et al.*, 1987), enzimas lisosomales como la α -manosidasa (*manA*) (Clarke *et al.*, 1987; Schatzle *et al.*, 1991), la fosfodiesterasa extracelular (*pdsA*) (Lacombe *et al.*, 1986; Rathi y Clarke, 1992), la glicoproteína de adhesión CadA (*cadA*) y el receptor del AMPc, *carA* (Rathi y Clarke, 1992). No se ha identificado el receptor de PSF, pero su actividad es independiente de proteína G y dependiente de PKA (Burdine y Clarke, 1995). PSF induce la traducción de la subunidad catalítica de PKA (Souza *et al.*, 1998) a través de la proteína quinasa YakA. PKA es un regulador central del desarrollo (Mann y Firtel, 1991; Mann *et al.*, 1997) cuya actividad, a través de diferentes factores de transcripción, induce la expresión de *acaA*, *carA*, *pdiA* y *pdsA*, esenciales para la síntesis-degradación-detección del AMPc (Otsuka y Van Haastert, 1998; Mu *et al.*, 2001). YakA induce la traducción de PKA-cat, a través de la inhibición de PufA, un represor de la traducción de PKA (Souza *et al.*, 1999), pero aún no se conoce la relación molecular existente entre PSF y YakA.

1.5.2 CMF: *Conditioned Medium Factor*

Ante la señal de ayuno total, la expresión de PSF cesa, y otra glicoproteína implicada en detectar la densidad celular comienza a secretarse de forma continua, CMF (*Conditioned Medium Factor*) (Jain *et al.*, 1992; revisado en Clarke y Gomer, 1995; Gomer *et al.*, 2011). CMF (*cmfA*) se expresa durante el crecimiento vegetativo pero se secreta, únicamente, a medida que aumenta el número de células en ayuno. El CMF, monitoriza la densidad de la población y sólo permite que la agregación comience si el número de células es lo suficientemente alto para formar un cuerpo fructífero capaz de dispersar las esporas. El mutante *cmfA* sólo agrega si se añade el caldo condicionado de células ayunadas en alta densidad (Jain *et al.*, 1992). El CMF controla la entrada en el desarrollo por medio de tres mecanismos regulatorios: la regulación de los genes del desarrollo, la de la señalización del AMPc, y la del citoesqueleto, que implican, al menos, dos receptores diferentes (Yuen *et al.*, 1995; revisado en Gomer *et al.*, 2011; Zouwail *et al.*, 2005).

El receptor CMFR-1 (*cmfB*) media las funciones dependientes de AMPc e independientes de proteína G, como la expresión de genes implicados en diferenciación celular (Deery *et al.*, 2002). El segundo receptor, no caracterizado, media las funciones de CMF dependientes de proteína G, como la regulación de la activación de AcaA (adenilato ciclasa) y de Gc (guanilato ciclasa), a través la proteína $G\alpha 1\beta\gamma$. La unión del CMF a su receptor putativo incrementa el tiempo de activación del complejo $G\alpha 2/GTP$, aguas abajo de CarA, evitando que se transduzca

la señal a través de AMPc-CarA hasta que el número de células (o CMF) no sea el suficiente (Brazill *et al.*, 1997). Existen vías inhibitoras y activadoras que regulan este proceso, entre ellas la subunidad $G\alpha 1$, que actúa como un regulador negativo de la vía (Brazill *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2011; Dharmawardhane *et al.*, 1994; Brazill *et al.*, 1997).

Tanto PSF como CMF inducen mecanismos de regulación del tamaño poblacional comparables a la función de las miostatinas (músculo) o leptinas (adipocitos) liberadas en mamíferos (Bakthavatsalam *et al.*, 2007). Existen otros mecanismos de control del tamaño del individuo en *D. discoideum* que se expondrán más adelante (AMPc, *Counting Factor*) (Brock *et al.*, 1996).

La expresión de otros genes, no bien caracterizados, como *dia1*, *dia2* y *dia3* (*differentiation associated proteins*) también comienza con la transición GDT (revisado en Maeda, 2011). Dia-2 es una proteína implicada en la regulación de la transcripción de genes de la agregación temprana y en la diferenciación terminal de las esporas (Chae *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 2008). Dia-2 se expresa únicamente en células en ayuno y su ausencia impide la agregación y produce bajos niveles de AMPc extracelular. Se postula que la regulación es a través de la expresión de *carA*, aunque no está probado (Chae *et al.*, 1998).

Se han descrito otros eventos asociados a la transición GDT, como cambios en el estado fosforilativo de GRP94 (*glucose regulated protein 94*), aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, etc. (revisado en Maeda *et al.*, 2011). Los eventos más importantes del GDT se resumen en el esquema de la Figura 6.

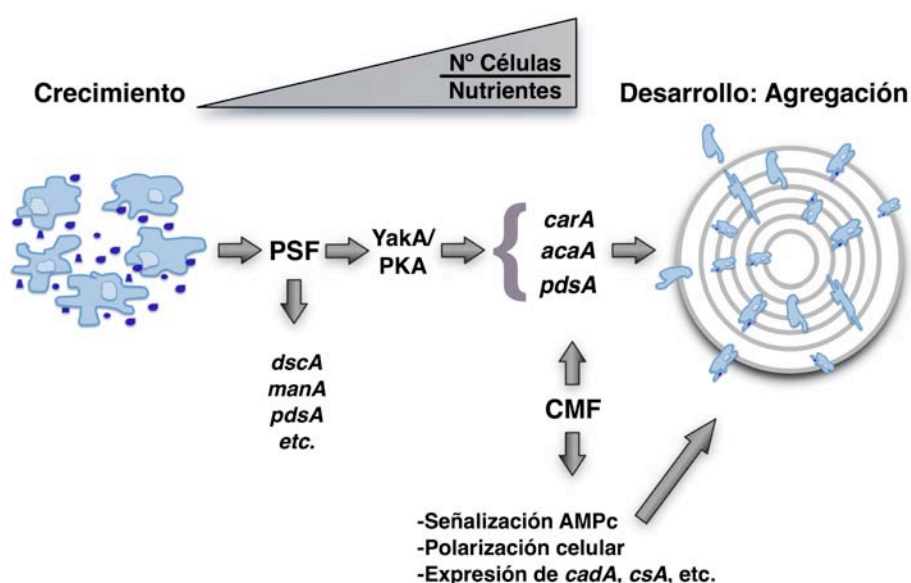


Figura 6. Esquema simplificado de los principales componentes del GDT.

1.6 AGREGACIÓN Y AMP CÍCLICO

1.6.1 La agregación está mediada por la quimiotaxis hacia el AMPc

El ayuno y la competencia para la agregación adquirida durante el GDT, promueven que $\approx 1 \times 10^5$ células converjan en torno a un centro de agregación, migren direccionalmente y se emitan señales mutuamente en respuesta a pulsos nanomolares de AMPc. Las células, ya han expresado los genes necesarios para la síntesis, detección y degradación del AMPc, el principal regulador de este complejo y organizado proceso.

En el año 1947 J.T. Bonner descubrió que era la quimiotaxis la fuerza que movía a las células a agregarse, ya que antes se habían contemplado otros posibles estímulos como el eléctrico o el magnético (Fig. 7) (Bonner, 1947). Fue en su laboratorio, un año más tarde, donde se identificó el AMPc como conductor de esta quimiotaxis en *D. discoideum* (Konijn *et al.*, 1969; Bonner *et al.*, 1969).

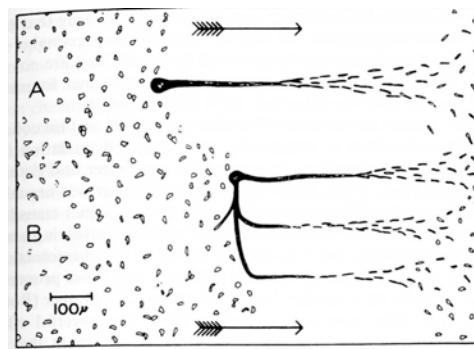


Figura 7. Descubrimiento de la quimiotaxis como ejecutora de la agregación. En A se aplicó una corriente de agua en la dirección de la flecha desde el inicio de la agregación, por lo que el quimioatrayente sólo podía fluir aguas abajo de la dirección de la corriente. En B, se permitió que la agregación comenzara en agua estancada y una vez formados los *streams* se aplicó la misma corriente. El resultado confirmó que el centro de agregación era la fuente del quimioatrayente y por eso las células aguas abajo de la corriente no se disgregan (Bonner, 1947).

El AMPc (adenosín monofosfato 3', 5' cíclico) es una molécula señalizadora universal y ancestral, presente desde arqueobacterias hasta la mayoría de invertebrados y vertebrados. Se descubrió en células hepáticas, en respuesta a su estimulación con glucagón (Sutherland y Rall, 1958). El AMPc actúa como mensajero secundario y transduce la señal de estímulos externos (glucosa, neurotransmisores, hormonas, luz, olores, adrenalina, etc.), pero en *D. discoideum* también actúa extracelularmente como mensajero primario o quimioatrayente. La capacidad de responder al AMPc secretado define el subgrupo 4 de *Dictyostelia*, el grupo monofilético que engloba a los miembros de *Amoebozoa* capaces de formar cuerpos fructíferos

multicelulares. Otros dictyostélidos responden a ácido fólico u otros quimioatrayentes (*glorin*, *pterin*), para agregar (Schaap, 2011b).

Durante la agregación, *Dictyostelium* establece pulsos oscilantes de concentración nanomolar de AMPc extracelular, a los que las células son sensibles, pero a medida que avanza el desarrollo la concentración de AMPc aumenta y su presencia se vuelve continua.

1.6.2 El inicio de la agregación es un proceso estocástico

El inicio del proceso de agregación es estocástico. Las células expresan los genes necesarios para la síntesis (*acaA*), detección (*carA*) y degradación (*pdsA*) del AMPc extracelular desde el GDT. A partir de las ≈ 4 h se acumulan niveles mínimos (por debajo del umbral) de AMPc extracelular de forma heterogénea y, a partir de este momento, algunas células, de forma estocástica, comienzan a responder y a secretar AMPc en forma de pulsos. Las células del entorno que detectan este AMPc a través de sus receptores de membrana (CarA) responden polarizándose hacia la fuente del quimioatrayente y emitiendo a su vez otro pulso de AMPc, amplificando así la señal. El AMPc se propaga en el espacio como ondas oscilatorias y tras ≈ 5 horas de ayuno, varios “centros” o grupos de células compiten entre sí para convertirse en “dominantes”, emitiendo pulsos con una frecuencia de 15-20 min. Las células del entorno se desplazarán de un centro a otro, hasta que el centro de agregación que pulse con mayor frecuencia (y por tanto emita más AMPc), domine ese territorio y atraiga a las células del entorno que pulsen con menor frecuencia. A partir de este momento (6-8 h) la frecuencia del pulso tendrá, invariablemente, un periodo de 6 min (Dinauer *et al.*, 1980; Gregor *et al.*, 2010) (Fig. 8). La existencia de las oscilaciones de AMPc exige que la fosfodiesterasa extracelular degrade el AMPc para que las células vuelvan al estado basal y vuelvan a ser receptivas al AMPc.

Este proceso rítmico y sincronizado a nivel poblacional tiene muchas homologías en organismos de todos los niveles evolutivos, desde la regulación de la secreción de la insulina por las células β y las oscilaciones en el estado redox de la levadura en ayuno de glucosa, hasta las ondas de potencial de acción de los miocardiocitos para coordinar el latido cardíaco, etc. (revisado en Kamino *et al.*, 2011).

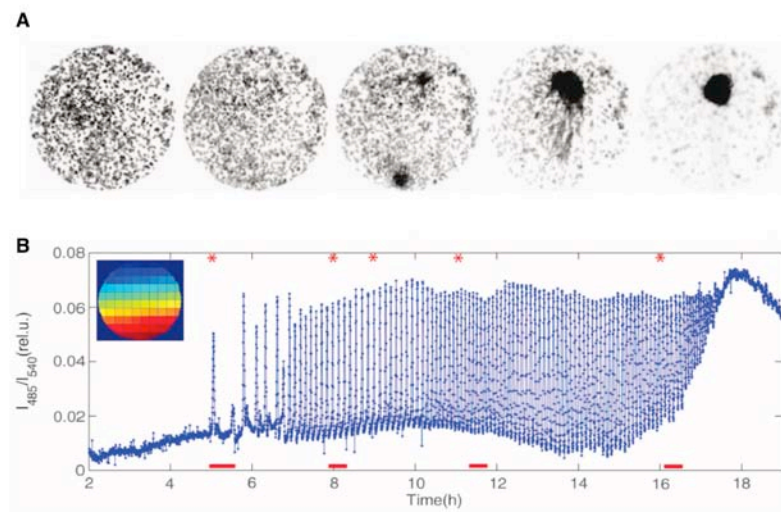


Figura 8. Proceso de formación de los pulsos de AMPc y su repercusión en el proceso de agregación. A) Imágenes de la progresión espacial de un número discreto de células en el inicio de la agregación. **B)** Gráfica que representa la formación de los pulsos AMPc en el inicio del desarrollo. Se muestra su amplitud y frecuencia, al principio variable, pero a partir de ≈ 8 h invariablemente periódica, con una frecuencia de 6 min. Los * en la gráfica B corresponden al momento de la agregación captado en las imágenes A (Gregor *et al.* 2010).

1.6.3 Señalización celular del AMPc y polarización

Debido a la importancia y la función dual del AMPc en el desarrollo de *D. discoideum*, la regulación del relé del AMPc es aún más compleja que en vertebrados (Shemarova, 2009). El AMPc secretado por las células se une a su receptor de membrana de tipo GPCR, CarA (receptor de AMPc de la agregación), acoplado a la proteína $G\alpha_2\beta\gamma$. CarA, sufre un cambio conformacional que permite la disociación de la subunidad $G\alpha_2$ y la $\beta\gamma$ a través del intercambio de GDP por GTP. A diferencia de los mamíferos, donde la activación de la adenilato ciclasa ocurre a través de $G\alpha$, en *D. discoideum* AcaA (adenilato ciclasa de la agregación) se activa indirectamente a través de $\beta\gamma$ (Kesbeke *et al.*, 1988). La subunidad $\beta\gamma$, a través de RasC, activa la PI3K (fosfoinositol 3-quinasa), que fosforila el lípido de membrana PIP2 a PIP3. PIP3 recluta proteínas con dominio PH (*pleckstrin homology*) a la membrana, como CRAC (*cytosolic regulator of adenylate cyclase*) o Akt/PKB. CRAC no es suficiente para activar ACA, también se requiere de ERK fosforilado y TORC2, un complejo proteico que incluye homólogos de mamíferos como Pianissimo (homólogo de Rictor), LST8, Rip3 (Sin1) y Raptor, y en cuya activación también están implicadas proteínas de la familia Ras. TORC2, a su vez, también es importante para fosforilar Akt/PKB y regular la polarización celular. AcaA, a partir de ATP, sintetiza AMPc para, en su mayoría (90%), ser secretado al medio extracelular. La fosfodiesterasa extracelular PdsA es la encargada de degradar el AMPc extracelular para re-

sensibilizar los receptores CarA. La afinidad de PdsA por el AMPc está controlada, a su vez por Pdi (*phosphodiesterase inhibitor*). En la Figura 9 se muestra un esquema con los principales componentes del relé del AMPc (revisado en Saran *et al.*, 2002; McMains *et al.*, 2008; Kortholt y Van Haastert, 2008).

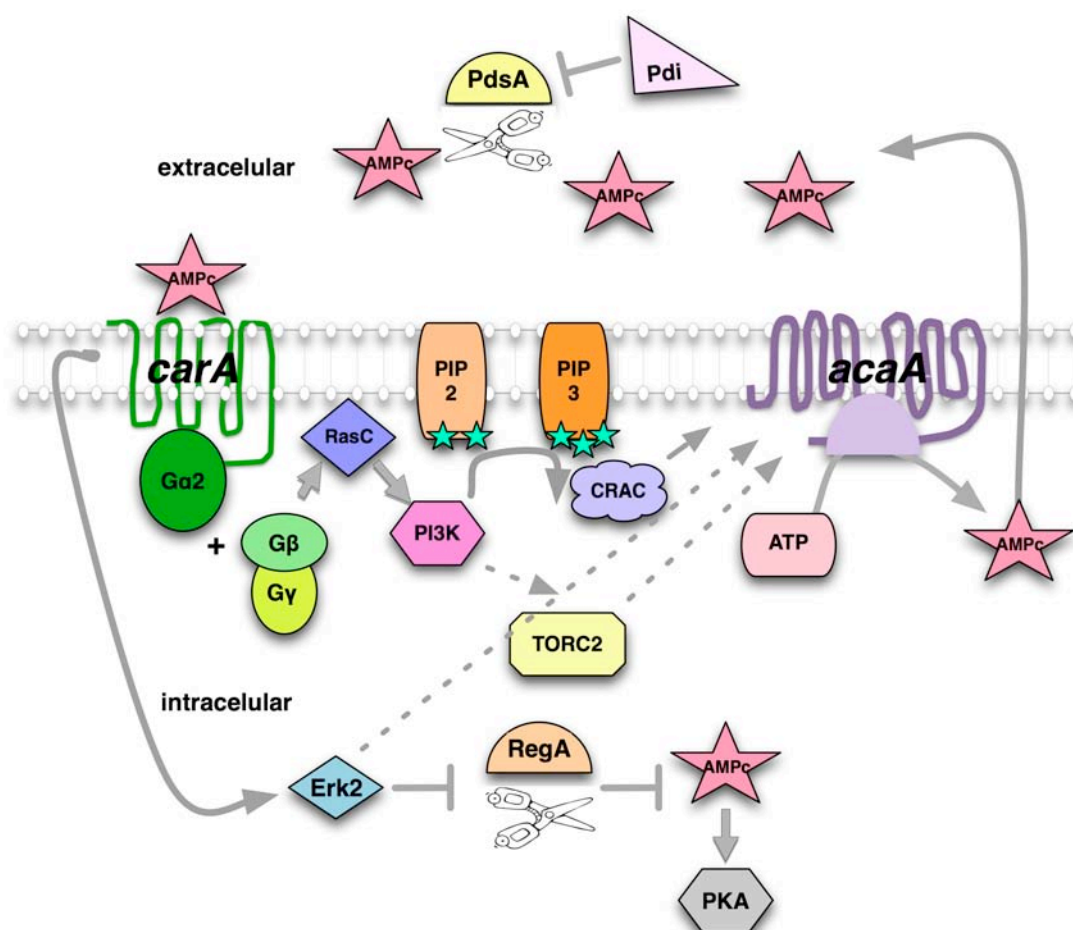


Figura 9. Esquema simplificado de la activación de AcaA y el relé del AMPc en *D. discoideum*.

El AMPc sintetizado por AcaA es secretado por la parte posterior de la célula (*trailing edge*), para favorecer la polarización celular y dar lugar a la formación de células en cadena (*streams*), dispuestas “cabeza-cola” (Kriebel *et al.*, 2003, 2008) (Fig. 10. A). La polarización implica la compartimentalización de los eventos y componentes del relé del AMPc (revisado en Manahan *et al.*, 2004; Mahadeo y Parent, 2006), además de otros procesos como la activación de Akt/PKB y su localización en el *leading edge* (parte delantera) de la célula (Meili *et al.*, 1999) (Fig. 10. B). La polarización también requiere una rápida reorganización del citoesqueleto; en el *leading edge* PIP3 induce la polimerización de las fibras de actina y la formación de los pseudópodos, mientras que en el *trailing edge*, los pseudópodos se retraen a través de la

señalización del GMPc (entre otros), y la fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) media la defosforilación de PIP3 a PIP2, para evitar la polimerización de la actina (Iijima y Devreotes, 2002).

Sólo un 10% del AMPc sintetizado permanece en el interior de la célula y activa la PKA, mientras el 90% se secreta al medio extracelular (Loomis *et al.*, 2008). No se ha caracterizado el mecanismo de secreción, pero se sabe que está restringido al *trailing edge* de la célula y que se hace a través de vesículas ricas en AcaA (Kriebel *et al.*, 2008).

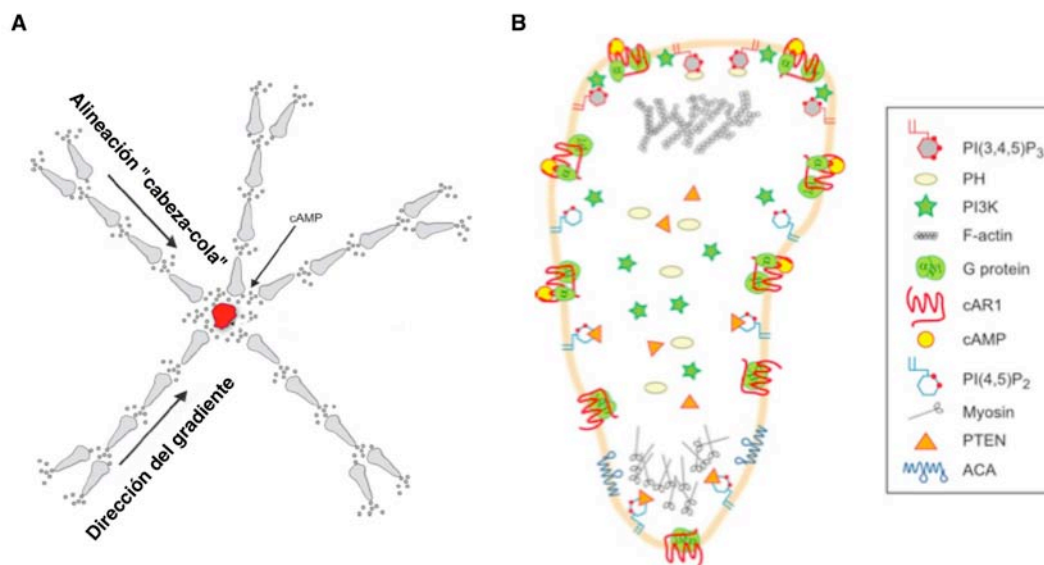


Figura 10. Esquema del proceso de agregación y polarización celular. A) Esquema simplificado del proceso agregativo. Las células, polarizadas, se disponen “cabeza-cola” y siguen un gradiente de AMPc al que responden generando, a su vez, más AMPc que se libera por el *trailing edge* y es detectado por la célula vecina. B) Esquema de la compleja compartimentalización intracelular de proteínas y factores necesarios para la correcta polarización celular y la quimiotaxis (Mahadeo y Parent, 2006; Manahan *et al.*, 2004).

1.6.4 Señalización a través de GMPc

Dictyostelium tiene dos guanilato ciclasas, cada una con dos dominios ciclasa: la soluble sGC (*sgcA*) y GC (*gcA*) con 12 dominios transmembrana. El AMPc, a través de $G\alpha_2\beta\gamma$, induce la activación de estas enzimas, que sintetizan GMPc. Éste, se une a las proteínas GbpC y GbpD que transmiten la señal a través de proteínas de la familia Ras y activan el dominio MAPKKKKinasa de GbpC, que fosforila la cadena pesada de la miosina. Este hecho es esencial para que los pseudópodos del *trailing edge* se retraigan y permitan la correcta polarización de la célula (revisado en Bosgraaf y Van Haastert, 2002). El nulo para las dos guanilato ciclasas (*gc-*) comienza a generar los pulsos de AMPc al mismo tiempo que el silvestre, ya que la señalización

del AMP no está afectada, pero los territorios de agregación tienen la mitad del tamaño del silvestre. Ésto se debe, a que cuando se forman los *streams*, se rompen inmediatamente por la hiperactividad en el *trailing edge* y el deficiente retraimiento de los pseudópodos (Veltman y Van Haastert, 2008). De las 7 fosfodiesterasas caracterizadas en *D. discoideum*, algunas tienen especificidad dual por GMPc y AMPc pero DdPDE3 (*pde3*) y DdPDE5 (*pdeD*) son específicas de GMPc (Bader *et al.*, 2007).

1.7 COMPONENTES Y REGULACIÓN DEL RELÉ DEL AMPc

D. discoideum ha desarrollado una fina maquinaria para regular de manera exhaustiva la detección, síntesis y degradación del AMPc. Los principales componentes de este relé son: CarA (receptor del AMPc de la agregación), AcaA (adenilato ciclasa de la agregación) y PdsA (fosfodiestera extracelular).

1.7.1 Receptores de AMPc (Car)

CarA pertenece a la familia de los receptores con 7 dominios transmembrana (7TM) acoplados a proteína G (GPCR) y media la respuesta al AMPc extracelular durante el inicio del desarrollo. *D. discoideum* expresa otros tres receptores del AMPc extracelular, que responden al quimioatrayente con un patrón de expresión temporal y espacial diferente, además de una sensibilidad decreciente hacia el AMPc: CarC, CarB y CarD, en este orden (revisado en McMains *et al.*, 2008; Louis *et al.*, 1993; Saxe *et al.*, 1991). Esta diferencia en la sensibilidad es, probablemente, el resultado de una adaptación a los niveles crecientes de AMPc que se acumulan durante el desarrollo multicelular (Kim *et al.*, 1998).

CarA es esencial para el relé del AMPc durante el desarrollo temprano y es el que presenta la máxima afinidad por el AMPc (≈ 30 nM), aunque también presenta una forma de menor afinidad (≈ 300 nM) al ser fosforilado y acoplarse a la proteína G (Johnson *et al.*, 1991). El mutante *carA*⁻ no agrega ni expresa los genes tempranos del desarrollo (Sun y Devreotes, 1991; Soede *et al.*, 1994). El defecto de *carA*⁻ no se restaura con la adición de concentraciones nanomolares de AMPc, sino que se requiere de concentraciones macromolares para restablecer la correcta agregación y la expresión génica a través de CarC (Pupillo *et al.*, 1992; Soede *et al.*, 1994). CarC, el receptor que sigue en afinidad a CarA, es el que sustituye parcialmente la función de CarA en el mutante *carA*⁻ (Soede *et al.*, 1994), y por ello, *carA*⁻ requiere de una mayor concentración de AMPc para restaurar la cantidad de AMPc secretada en el pulso (30 μ M frente a 100 nM en AX2) (Insall *et al.*, 1994b). El fenotipo del doble mutante *carA*⁻/*carC*⁻ confirmó la funcionalidad de CarC en la agregación, ya que no agrega ni expresa

marcadores de agregación y el relé de AMPc es inexistente, debido a la ausencia de receptores de superficie (Insall *et al.*, 1994b). La expresión constitutiva de *carA*, sin embargo, no da lugar a un fenotipo dramático en agregación, salvo un retraso de 1-3 horas en el inicio de la misma (Johnson *et al.*, 1991).

CarA también media respuestas independientes de proteína G, como su propia fosforilación, o la fosforilación de Erk2, que tienen lugar tanto en *ga2⁻* como en *βγ⁻* (Maeda *et al.*, 1997).

1.7.1.1 El proceso de desensibilización de CarA para adaptar el relé

La existencia de los pulsos de AMPc conlleva implícita la degradación del AMPc por las fosfodiesterasas extracelulares y la adaptación del receptor. La adaptación consiste en la desensibilización transitoria de los receptores CarA para que la activación de la AcaA no sea constante, deje de producirse AMPc y se restablezca el relé. En mamíferos, la adaptación está mediada por proteínas G inhibitoras y/o la fosforilación y posterior secuestro por arrestinas del receptor (Ferguson y Caron, 1998), pero en *D. discoideum* este proceso no está bien caracterizado. En *Dictyostelium*, la unión del AMPc al receptor (CarA) induce la fosforilación de residuos específicos en el extremo carboxilo terminal de CarA, que disminuyen la afinidad del receptor 3-5 veces (Caterina *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1999) y esta disminución es reversible por tratamiento con fosfatasas (Xiao *et al.*, 1999). Sin embargo, en mutantes puntuales en los sitios de fosforilación, sigue existiendo adaptación de la actividad AcaA, lo que sugiere que no está únicamente mediada por la fosforilación del receptor, sino por procesos aguas abajo del mismo (Kim *et al.*, 1997). Se ha identificado una proteína inhibitoria, Gα9, y su mutante nulo, *gpa1⁻*, acelera el proceso de agregación, amplificando la señalización del AMPc, GMPc y la actividad de AcaA y fosforilación de PIP3 (Brzostowski *et al.*, 2002, 2004). Se propone que Gα9 inhibe la transducción de la señal aguas abajo de CarA a través de la unión a proteínas Ras, comunes en la activación de AcaA, GC y PI3K (Brzostowski *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha identificado la diana de Gα9 y, además, *gpa1⁻* muestra cierto grado de adaptación de ACA, por lo que deben existir otros componentes en el proceso de adaptación. Se ha propuesto que la activación de la PI3K en el *leading edge* tiene, además, una función inhibitoria sobre la activación de ACA, ya que la inhibición de PI3K con LY294002 así como el nulo de *pi3k¹⁻²* muestran graves defectos en el proceso de adaptación (Comer y Parent, 2006).

1.7.1.2 Regulación transcripcional de *carA*

carA es uno de los primeros componentes del relé en expresarse, con un pico de expresión máxima entre las 5 y 10 horas del desarrollo (Saxe *et al.*, 1991). Durante la transición GDT se induce por PSF y YakA (Rathi y Clarke, 1992) y durante el desarrollo, por

AMPC a través del factor de transcripción CRTF (*CarA Transcription Factor*) (Louis *et al.*, 1993; Iranfar *et al.*, 2003; Mu *et al.*, 2001). Su expresión, junto a *pdsA* y *gpaB* (subunidad alfa 2 de la proteína G acoplada a CarA) es independiente de AMPC, aunque inducible por el mismo, de hecho, se expresa correctamente en células *acaA* y *acaA/acrA* sin pulsar (Iranfar *et al.*, 2003). Su transcripción está controlada por dos promotores, uno “temprano” y otro “tardío” que dan lugar a dos transcritos alternativos que codifican la misma proteína. El promotor temprano dirige la transcripción de forma exclusiva en el inicio del desarrollo, durante la agregación temprana (hasta ≈ 5 h). A partir de este momento comienza a expresarse el “tardío” y después de ≈ 10 h el “temprano” deja de detectarse y el “tardío” dirige la transcripción hasta la culminación (Saxe *et al.*, 1991; Louis *et al.*, 1993). Acorde con su patrón temporal de expresión, el promotor “temprano” se induce con concentraciones nanomolares de AMPC, y se satura frente a cantidades constantes y elevadas del mismo, mientras el “tardío”, responde a concentraciones más elevadas del quimioatrayente (Louis *et al.*, 1993). El factor de transcripción CRTF dirige la transcripción del promotor temprano. El mutante *crtf* sólo consigue agregar en condiciones de alta densidad celular, no expresa genes dependientes de pulso de AMPC, como *csA*, pero sí niveles mínimos de *carA* y *gpaB*. Este dato, unido al hecho de que pulsos nanomolares de AMPC restauran el nivel de expresión de estos genes, indica la existencia de otros reguladores de este promotor, aunque a día de hoy no se han identificado (Mu *et al.*, 2001).

1.7.2 Adenilato ciclasas

En *D. discoideum* la síntesis de AMPC está mediada por tres adenilato ciclasas de tipo III, con diferente topología, regulación y función en el desarrollo: AcaA (*acaA*), AcaB (*acrA*) y AcaG (*acg*).

AcaA es la adenilato ciclasa esencial durante la agregación. Consta de 2 módulos con 6 dominios transmembrana cada uno, separados por un *loop* intracelular donde residen los dominios ciclasa 1 y 2. Estos dominios catalíticos dimerizan cuando la enzima se activa y sintetizan AMPC a partir de ATP. AcaA presenta una alta homología en su dominio catalítico con la adenilato ciclasa acoplada a proteína G de mamíferos y *Drosophila* (revisado en Kriebel y Parent, 2004; Verkerke-van Wijk *et al.*, 2001). La activación de AcaA alcanza su pico de máxima actividad 1 min después de la unión del AMPC a CarA y vuelve al estado basal en 7-10 min (Pitt *et al.*, 1992). Aunque parte del AMPC producido permanezca dentro de la célula para activar la PKA y otras rutas, la mayoría (90%) se secreta para atraer a las células vecinas (Mahadeo y Parent, 2006; Loomis, 2008).

La relevancia de *acaA* en el proceso de agregación queda de manifiesto en el fenotipo de la

cepa *acaA*⁻, que no consigue agregar (Pitt *et al.*, 1992) ni expresar genes esenciales de la agregación como *carA* o *csA* (Pitt *et al.*, 1993). Aunque el crecimiento, la motilidad celular, la quimiotaxis o la inducción de GMPc inducido por AMPc estén intactos en este mutante, la incapacidad de establecer los pulsos de AMPc con la periodicidad e intensidad adecuada son los causantes del dramático fenotipo (Pitt *et al.*, 1992). Este defecto se restaura depositando las células *acaA*⁻ en sinergia con células silvestres o mimetizando los pulsos de AMPc externamente: añadiendo concentraciones nanomolares (30 nM) de AMPc cada 6 min a células ayunadas en agitación (Pitt *et al.*, 1993). La expresión constitutiva de *acaA*, por el contrario, da lugar a agregados más pequeños y numerosos, consecuencia de un aumento de la actividad adenilato ciclasa de hasta 25 veces respecto a la silvestre (Pitt *et al.*, 1992).

AcaB tiene dos dominios hidrofóbicos en el N-terminal, un dominio pseudo-histidina quinasa y un único dominio catalítico en el C-terminal con alta homología con las adenilato ciclasas de cianobacterias (*Anabaena spirulensis*) (revisado en Kriebel y Parent, 2004). Está constitutivamente activa y es insensible a la presencia de AMPc extracelular, DIF o amonio y es independiente de proteína G (Meima y Schaap, 1999). La actividad de AcaB es esencial durante el desarrollo tardío, por ello el mutante *acrA*⁻ muestra un fenotipo silvestre hasta el estadio de *slug* pero los cuerpos fructíferos que forma tienen un tallo excesivamente alargado y esporas muy inestables (Söderbom *et al.*, 1999). El AMPc producido por AcaB está regulado por la fosfodiesterasa intracelular RegA. La expresión constitutiva de AcaB en el fondo *acaA*⁻ permite la formación de algunos *mounds* y cuerpos fructíferos, pero la agregación no está mediada por oscilaciones de AMPc y no se restaura (Pitt *et al.*, 1993).

AcaG consta de un dominio extracelular conectado a una región transmembrana y un único dominio catalítico citosólico. Se expresa de manera exclusiva al final del desarrollo, una vez que los cuerpos fructíferos se han formado, en los estadios finales de la formación de las esporas. Su activación es independiente de proteína G (Pitt *et al.*, 1992) y dependiente de alta osmolaridad, que activa la enzima a través del dominio extracelular (Saran y Schaap, 2004). Funciona como un osmosensor durante la germinación de las esporas (van Es *et al.*, 1996), activando la PKA para el mantenimiento de la quiescencia de las esporas hasta que las condiciones de osmolaridad sean más adecuadas para la germinación.

1.7.2.1 Regulación transcripcional de *acaA*

La expresión más temprana de *acaA*, durante la transición GDT y la agregación, está mediada por el factor de transcripción MybB (Otsuka y Van Haastert, 1998) y por CbfA en estadios posteriores (Sjol *et al.*, 2006; Winckler *et al.*, 2004). Los mutantes *acaA*⁻, *mybB*⁻ y *cbfA*⁻ son incapaces de agregar si no están acompañados de células silvestres o se pulsan

exógenamente con AMPc (Pitt *et al.*, 1993; Otsuka y Van Haastert, 1998; Winckler *et al.*, 2004). La expresión de *acaA* está dirigida por tres promotores alternativos, con un patrón temporal y espacial característico y alcanza su máximo entre 8 y 10 horas del desarrollo (Verkerke-Van Wijk *et al.*, 2001; Galardi-Castilla *et al.*, 2010). El promotor 1 (-2638 al -2415) dirige la expresión durante la agregación temprana y está ausente en *slugs* y esporas. La actividad del promotor 2 (-1485 al -1215) se restringe a la región pre-espora y/o ALC y esporas, mientras que el promotor 3, el más cercano al ATG (-558 al -380), regula la expresión en las células del *tip* y algunas pre-espora, manteniéndose activo en esporas (Galardi-Castilla *et al.*, 2010).

1.7.3 Fosfodiesterasas

La generación de la señal de AMPc es tan importante como su degradación durante todo el ciclo de desarrollo. La hidrólisis del enlace fosfodiéster 3'-5 es tan crucial que *D. discoideum* codifica 7 enzimas con actividad fosfodiesterasa, con diferente localización y especificidad por AMPc o GMPc (Bader *et al.*, 2007). PdsA (DdPDE1) es una fosfodiesterasa de clase II con especificidad dual por AMPc y GMPc, secretada para degradar el *pool* de AMPc extracelular durante la agregación. DdPDE4 (clase I) y DdPDE 7 (clase II) también degradan el AMPc extracelular; DdPDE4 lo hace en estadios multicelulares tardíos y DdPDE7, homólogo cercano de PdsA, es activo durante la agregación. *regA* (DdPDE2) (clase I) regula la concentración intracelular de AMPc controlando la activación de la PKA. DdPDE6 (clase II) degrada mayoritariamente AMPc intracelular aunque también GMPc, en menor medida. DdPDE3 y DdPDE 5 son fosfodiesterasas de GMPc exclusivamente. La fosfodiesterasa cuya actividad es más importante en el relé de AMPc durante la agregación es PdsA (DdPDE1) (Bader *et al.*, 2007).

1.7.3.1 Fosfodiesterasa extracelular de la agregación: PdsA

PdsA es el máximo responsable de hidrolizar el AMPc extracelular, absolutamente esencial para que tenga lugar la desensibilización de los receptores CarA y por tanto la existencia de los pulsos de AMPc (Saran *et al.*, 2002). La concentración de AMPc durante los pulsos cada 6 min, oscila entre 1 nM y 1 μ M, y en este rango el 97% de la actividad fosfodiesterasa recae sobre PdsA. Su actividad es sensible a DTT y no a IBMX (Bader *et al.*, 2007). La enzima es secretada al medio extracelular a través de un mecanismo no caracterizado (García *et al.*, 2009). A pesar de la controversia sobre la existencia de otra forma de PdsA, anclada a la membrana plasmática, expuesta al medio extracelular y codificada por el mismo gen (Malchow *et al.*, 1972; Lacombe *et al.*, 1986; Bader *et al.*, 2007; Palsson, 2009), se ha

demostrado que la única forma activa es la extracelular y que la porción anclada a membrana es producto de la contaminación del retículo endoplasmático (García *et al.*, 2009).

Las células *pdsA*⁻ apenas presentan actividad fosfodiesterasa extracelular y no agregan en ausencia de nutrientes (Darmon *et al.*, 1978; Barra *et al.*, 1980; Sucgang *et al.*, 1997). La adición de PdsA purificado restaura la competencia para la agregación en estas células (Barra *et al.*, 1980; Faure *et al.*, 1989) aunque no pasan del estadio *loose mound* (Sucgang *et al.*, 1997) y tampoco consiguen el correcto alineamiento “cabeza-cola” que caracteriza el *streaming* (García y Parent, 2009). La incubación con el caldo condicionado de 7 horas de ayuno del silvestre, también restaura la agregación en este mutante, por la existencia de PdsA activa en el mismo (Darmon *et al.*, 1978). Las células *pdsA*⁻ mezcladas en quimeras con células silvestres se mueven sin un patrón definido en *mounds* y están menos representadas de lo esperado en las esporas, lo que pone de manifiesto la importancia de PdsA también en estadios posteriores del desarrollo, como la culminación (Sucgang *et al.*, 1997). Las células AX2, que expresan constitutivamente PdsA, agregan de forma acelerada y aberrante, en “grumos” de células sin haber formado *streams* previamente y la morfogénesis tardía está bloqueada (Faure *et al.*, 1988). Ni la delección ni la sobreexpresión de ninguna de las adenilato ciclasas produce efectos tan dramáticos en la agregación (revisado en Saran *et al.*, 2002; Weening *et al.*, 2003), lo que pone de manifiesto la importancia de la degradación de la señal en el mantenimiento del relé de AMPc.

1.7.3.2 Regulación transcripcional de *pdsA*

La expresión de *pdsA* está regulada durante el desarrollo (Lacombe *et al.*, 1986) y está dirigida por tres promotores alternativos que dan lugar a tres transcritos de diferente tamaño que se expresan durante el crecimiento vegetativo (1,9 kb), la agregación (2,4 kb) y en etapas tardías (2,2 kb) (Faure *et al.*, 1990). Este último se expresa en las células pre-tallo, durante la formación de *slugs* y en la diferenciación terminal (Hall *et al.*, 1993; Podgorski *et al.*, 1988).

La agregación de *pdsA*⁻ se restaura cuando la región codificante de PdsA se expresa bajo el promotor específico de la agregación en alto número de copias; aunque sólo en condiciones de alta densidad celular, porque, a pesar de la selección con antibiótico para mantener el alto número de copias, la cantidad de PdsA secretada por el transformante es inferior a la del silvestre (Sucgang *et al.*, 1997). Por su parte, la restauración del fenotipo en el *slug* y diferenciación terminal en *pdsA*⁻ tiene lugar cuando *pdsA* se expresa bajo el promotor tardío (Sucgang *et al.*, 1997).

La expresión de PdsA está inducida por PSF durante la transición GDT (Clarke y Gomer, 1995) y posteriormente regulada al alza en presencia de AMPc; tanto en forma de pulsos como constante (Yeh *et al.*, 1978; Franke *et al.*, 1987; Iranfar *et al.*, 2003). El promotor tardío es inducible por DIF; reflejo de su importancia en el desarrollo terminal y diferenciación (Franke *et al.*, 1991). En el mutante *pdsA*⁻, la expresión del promotor temprano de *carA*, inducible por pulsos de AMPc y represible por cantidades constantes, está ausente; no así la expresión del promotor tardío (Sugang *et al.*, 1997). En *carA*⁻, sin embargo, los transcritos *pdsA* específicos del crecimiento (1,9 kb) y de la agregación (2,4 kb) sí se expresan débilmente (Sun y Devreotes, 1991), además, ambos se inducen con pulsos de AMPc incluso en el doble mutante *carA*⁻/*carC*⁻ (Wu *et al.*, 1995a). Esto indica que no toda la expresión de PdsA es dependiente de la unión del AMPc a su receptor. Además, *pdsA* es uno de los tres genes tempranos independientes de pulso de AMPc, ya que se expresa en células *acaA*⁻ e incluso *acaA*⁻/*acrA*⁻ sin mimetizar exógenamente los pulsos de AMPc (Iranfar *et al.*, 2003).

1.7.3.3 Pdi (phosphodiesterase inhibitor).

La actividad, pero no la expresión, de PdsA está regulada por Pdi, una glicoproteína que inhibe su función (Adames *et al.*, 1994; Riedel y Gerish, 1971; Wu y Franke, 1990; Franke *et al.*, 1991). Pdi se une a PdsA con estequiometría 1:1 y actúa disminuyendo drásticamente la afinidad de PdsA por el AMPc de 5 μ M a 2 mM (Franke *et al.*, 1991; Kessin *et al.*, 1979). Pdi es una proteína rica en cisteínas (15%), por lo que se inactiva de forma irreversible por reducción ante la presencia del agente reductor DTT (1 mM) (Kessin *et al.*, 1979; Franke y Kessin, 1981), que en concentraciones más altas (5-10 mM) inhibe de manera competitiva la propia PdsA (Devreotes y Shering, 1985).

Pdi comienza a secretarse durante la transición GDT como un transcrito de 0,95 kb (Wu y Franke, 1990; Wu *et al.*, 1995b) y se expresa de forma mayoritaria entre 2 y 8 h del desarrollo (Franke *et al.*, 1991). Su expresión se reprime por la presencia de AMPc, a través de CarA pero independientemente de $G\alpha_2\beta\gamma$ (Wu *et al.*, 1995b). Esto permite monitorizar los niveles de AMPc y aumentar la actividad fosfodiesterasa cuando las condiciones lo requieren (Franke *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1995b). La subunidad catalítica de PKA (PKAc_{at}) es necesaria para la síntesis del RNAm de *pdiA*, sobre todo en la transición GDT (Wu *et al.*, 1995a).

El mutante *pdiA*⁻ no consigue establecer correctamente los pulsos y establece territorios de agregación pequeños y con retraso, pero a pesar de ello consigue agregar y formar cuerpos fructíferos de menor tamaño (Wu *et al.*, 1995b; Palsson *et al.*, 1997).

No se han identificado inhibidores de fosfodiesterasa con este modo de acción en ningún otro organismo.

1.7.4 Otros componentes del relé de AMPc

La fosforilación de **Erk2** (*extracellular signal-regulated kinase 2*) es necesaria para la correcta activación de AcaA, y el mutante *erk2⁻* no agrega (Segall *et al.*, 1995). Erk2 fosforilado inhibe la fosfodiesterasa intracelular **RegA**, impidiendo que ésta degrade el AMPc intracelular, con lo que aumenta la concentración intracelular de AMPc y se activa la **PKA** (ver Fig. 9). La PKA está formada por una única subunidad reguladora (R) a la que se une el AMPc, y una catalítica (C), que se disocia y se activa tras la unión de AMPc a R (Loomis *et al.*, 1998). Ambas subunidades son esenciales para la agregación y la disrupción de cualquiera de las dos da lugar a células viables pero incapaces de agregar ni diferenciar (Mann y Firtel, 1991). La agregación y expresión génica se restauran con pulsos de AMPc (Mann y Firtel, 1991; Harwood *et al.*, 1992; Pitt *et al.*, 1993). La actividad de PKA durante la GDT es esencial e independiente de AMPc (Mann y Firtel, 1991; Wu *et al.*, 1995a; Schulkes *et al.*, 1995). Durante la agregación o el desarrollo temprano, la ausencia de PKA se suple con AMPc extracelular (Pitt *et al.*, 1993; Iranfar *et al.*, 2003), pero es esencial para la diferenciación celular (Mann *et al.*, 1994) y la expresión génica post-agregativa (Iranfar *et al.*, 2003). Es previsible que toda la señalización mediada por AMPc en estadios post-agregativos se transduzca a través de PKA-cat, porque la cepa *acaA⁻/A15* PKA-cat, a pesar de no producir niveles detectables de AMPc, culmina y forma cuerpos con una óptima proporción de tipos celulares (Wang y Kuspa, 1997). En cuanto al relé de AMPc, PKA inhibe indirectamente la activación de la adenilato ciclasa y la fosforilación de Erk2 (Aubry *et al.*, 1997).

1.7.5 Regulación del relé de AMPc

La regulación del relé de AMPc durante la agregación es sumamente compleja. Se trata de un circuito cerrado retroalimentado, donde variaciones en uno de los componentes repercuten en cada uno de ellos. W.F. Loomis diseñó un modelo matemático en forma de circuito oscilatorio de AMPc, donde se incluyen las variables que más afectan al relé del AMPc (Loomis, 2008) (Fig. 11). La activación de AcaA induce la síntesis de AMPc extracelular, que se unirá a CarA, induciendo la fosforilación de Erk2, además de la activación de AcaA. Erk2 activado, inhibe la función de RegA (fosfodiesterasa intracelular), elevando los niveles de AMPc intracelular. La mayoría del AMPc generado se secreta (90%) para poder estimular a otras

células antes de ser degradada por PdsA, la fosfodiesterasa extracelular, pero el 10% que se mantiene en la célula activa PKA, que a su vez inhibe tanto Erk2 como AcaA. RegA se activa por fosfatasa para reducir la concentración intracelular de AMPc y reiniciar el circuito.

Las conexiones de este circuito se establecieron a partir de las evidencias bioquímicas obtenidas de células silvestres, nulas y sobreexpresoras de los diferentes componentes del relé, que permitieron generar las ecuaciones que mejor se ajustaban para el modelo de oscilaciones estables (Maeda *et al.*, 2004). Otros componentes del relé que modifican la señal ($G\alpha_2\beta\gamma$, CRAC, PI3K, etc.), no se incluyeron en el modelo, ya que no eran indispensables para generar una predicción certera de las oscilaciones. Del modelo, se extrae que, para variar la periodicidad de la onda (6 min) se requiere la modificación de más de un parámetro, mientras que la amplitud de la onda es más susceptible de modificarse con la alteración de un solo parámetro (Loomis, 2008).

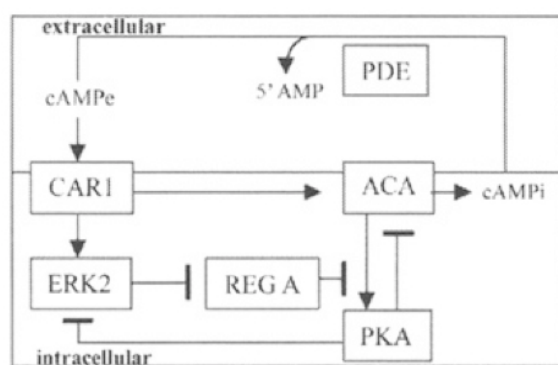


Figura 11. Esquema del circuito propuesto para modelar el relé del AMPc (Loomis, 2008).

1.7.6 AMPc durante la culminación

Los requerimientos de AMPc varían a lo largo del desarrollo. En el estadio de *slug* se genera un gradiente de AMP desde la región del *tip* u organizador, que emite AMPc extracelular de forma constante durante el periodo post-agregativo (Bonner, 1947; Verkerke Van-Wijkt *et al.*, 2001). Este gradiente dirige la correcta segregación posicional de las células pre-tallo y pre-espora en el *slug* y estadios posteriores (Dormann *et al.*, 2000). La actividad de la región promotora de *acaA* descrita por Verkerke Van-Wijk y colaboradores (Verkerke Van-Wijkt *et al.*, 2001), es esencial para la correcta culminación a través de la activación de STATa (*signal transducer and activator of transcription family protein A*) que dirige la transcripción de CudA

(*culmination defective*) y sus dianas, como *expl7*, esenciales en la culminación (Fukuzawa *et al.*, 1997; Fukuzawa y Williams, 2000; Mohanty *et al.*, 1999; Wang y Williams, 2010).

La correcta expresión de *pdsA* a partir del promotor tardío en las células pre-tallo es esencial para que se complete la morfogénesis (Faure *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1995b). Además, la expresión constitutiva de *pdsA* a partir de este promotor, bloquea el desarrollo tras la formación del *mound*, e induce una localización de las células pre-tallo *pstA* aberrante que anula la formación del *tip* (Traynor *et al.*, 1992).

1.8 ADHESIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE *D. DISCOIDEUM*

Las proteínas de adhesión célula-célula, junto a las de señalización intercelular y diferenciación, constituyen las herramientas genéticas de la multicelularidad (revisado en Abedin y King, 2010). La correcta regulación de las moléculas de adhesión es esencial para mantener la integridad del estado multicelular, y su desregulación se manifiesta en múltiples aspectos del desarrollo, fagocitosis, agregación, incluso diferenciación y morfogénesis (Siu *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2006, Benabentos *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Sriskanthadevan *et al.*, 2011). *D. discoideum* es un excelente modelo para el estudio de la adhesión intercelular. El pionero en el estudio de las CAM (*Cell Adhesion Molecules*) en *D. discoideum* fue G. Gerish, que caracterizó la primera molécula de adhesión descrita en todos los organismos: CsA (*contact sites A*) (Müller *et al.*, 1979).

1.8.1 Moléculas de adhesión (CAM) en el desarrollo de *D. discoideum*

En *D. discoideum* la expresión temporal de las principales proteínas implicadas en la adhesión célula-célula está estrictamente regulada, y el inicio de su expresión coincide con transiciones a una mayor complejidad morfogénica. *cadA* se expresa desde la transición GDT hasta el desarrollo terminal y su función es dependiente de Ca^{2+} (sensible a EDTA) (Wong *et al.*, 1996, 2002). El inicio de la expresión de *csA* coincide con el inicio de la agregación (≈ 4 h) y *tgrC* comienza a expresarse débilmente durante el final de la agregación para acumularse durante el estadio de *mound* hasta la diferenciación terminal (Fig. 12). La adhesividad mediada por CsA y TgrC es resistente a la presencia de EDTA. Se sabe de la existencia de una cuarta CAM, sensible a EDTA y dependiente de Mg^{2+} que se expresa al mismo tiempo que CadA, pero no ha podido ser caracterizada (Fontana *et al.*, 1993). La expresión de los tres genes, *cadA*, *csA* y *tgrC*, es inducible en diferente grado por AMPc (revisado en Siu *et al.*, 2004)

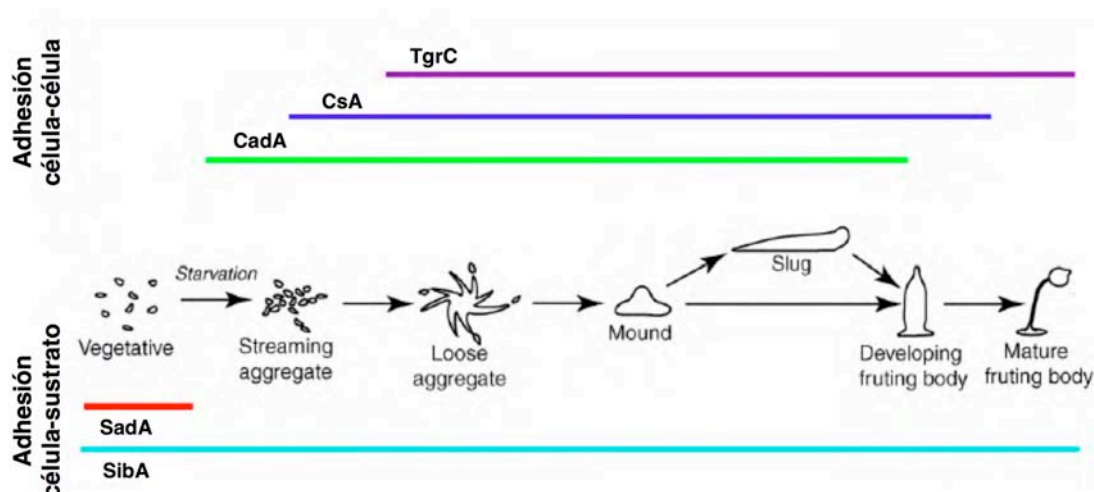


Figura 12. Patrón temporal de expresión de las principales proteínas de adhesión intercelular y célula-sustrato durante el desarrollo de *D. discoideum*. Modificado de Abedin y King, 2010.

1.8.1.1 Adhesión célula-célula

1.8.1.1.1 CadA (calcium adhesion protein)

CadA presenta cierta homología con las cadherinas de metazoos (Wong *et al.*, 1996). En el inicio del desarrollo, CadA se localiza asociada a la F-actina de los pseudópodos del *leading edge*, para establecer los primeros contactos con las células adyacentes. Una vez *csA* comienza a expresarse, CadA se internaliza y CsA se encarga de establecer uniones intercelulares más fuertes (Sesaki *et al.*, 1996). Esta re-distribución de CadA refleja la naturaleza dinámica de la morfogénesis de *D. discoideum* y la necesidad de establecer contactos que permitan su fácil disociación para crear otros nuevos.

La ausencia de *cadA* da lugar a fenotipos muy dramáticos, como defectos en morfogénesis, retraso en el inicio del desarrollo, y una segregación celular aberrante (Wong *et al.*, 2002). Es interesante observar que en quimeras con células silvestres, las células *cadA*⁻ se comportan como *cheaters* (embaucadores), dirigiendo las células silvestres a la región pre-tallo y asegurando su supervivencia en forma de esporas, tal como se ha descrito en ciertas condiciones para el mutante *padA*⁻ (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Sin embargo, en placas de tierra, más parecidas a su hábitat natural, las células *cadA*⁻ muestran el comportamiento opuesto, y se localizan en regiones pre-tallo (Sriskanthadevan *et al.*, 2011).

La expresión de *cadA* se detecta desde la transición GDT (Knecht *et al.*, 1987) y durante el inicio de la agregación responde a pulsos nanomolares de AMPc (Yang *et al.*, 1997). El análisis

de la región 5' de *cadA* ha confirmado la presencia de una región rica en G+C donde se encuentran dos secuencias consenso de elementos de respuesta a AMPc (GTGTG) y cuatro cajas TTG de respuesta a PSF (Srisanthadevan *et al.*, 2011) similares a las de *dscA* o *manA* (genes que codifican la discoidina y α -manosidasa) (Vauti *et al.*, 1990; Schatzle *et al.*, 1991). Recientemente, se ha demostrado que Hbx4, un regulador transcripcional de la familia Hox (*Homeobox proteins*) regula también su transcripción uniéndose a una región de su promotor (Kim *et al.*, 2011).

1.8.1.1.2 *CsA (contact sites A)*

csA codifica una glicoproteína que media la adhesión célula-célula de una forma EDTA independiente (Müller *et al.*, 1979; Noegel *et al.*, 1986) y está lejanamente relacionada con la superfamilia de proteínas de adhesión Ig, entre las que se encuentra NCAM (*neural cell adhesion molecule*) (Siu *et al.*, 1990). La transcripción de *csA*, posterior en el tiempo a la de *cadA*, está regulada por dos mecanismos. Se expresa de forma basal en estadios pre-agregativos a través de un mecanismo AMPc-independiente, pero es fuertemente inducible por pulsos de AMPc (Siu *et al.*, 1988; Desbarats *et al.*, 1992; Iranfar *et al.*, 2003). Su promotor contiene elementos de respuesta a AMPc (Desbarats *et al.*, 1992), al igual que el de *cadA*. En el mutante *acaA* no se induce la expresión de *csA*, pero sí se expresa al aplicar pulsos externos de AMPc (Pitt *et al.*, 1993).

La ausencia de CsA da lugar a una mayor adhesión al sustrato y una motilidad reducida, que se traduce en que pocas células pueden entrar en agregación y formar esporas (Ponte *et al.*, 1998). Se ha documentado que los niveles de CsA están positivamente relacionados con el tamaño de los agregados y los *slug* (Kamboj *et al.*, 1990). Esto concuerda con la regulación negativa ejercida por el *Counting Factor* (CF) sobre los niveles de proteína de *CadA* y *CsA*. CF es un complejo multiproteico secretado que actúa regulando el tamaño de los agregados mediante la regulación de la motilidad y la adhesividad celular (Roissin-Bouffay *et al.*, 2000).

1.8.1.1.3 *TgrC (Tiger C)*

TgrC media uniones heterofílicas independientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el desarrollo post-agregativo, que son esenciales para el reconocimiento de semejantes (Hirose *et al.*, 2011). La expresión de *tgrC* comienza hacia el final del proceso de agregación (≈ 8 h) pero su ARNm se acumula de forma máxima en el estadio de *mound* y continúa con niveles altos hasta la culminación (≈ 24 h) (Dynes *et al.*, 1994). A pesar de que se han encontrado regiones en su promotor con alta homología a los elementos de respuesta al AMPc, *tgrC* responde mínimamente a pulsos de AMPc, y su expresión se induce por los niveles más altos y

constantes de AMPc que tienen lugar en estadios post-agregativos (Dynes *et al.*, 1994; revisado en Siu *et al.*, 2011). Sin embargo, en un ensayo de micromatrices en el que se comparaba la expresión de células silvestres con y sin pulsar con AMPc, *tgrC* (y otros dos miembros de su familia), se catalogaron como pulso-dependientes (Iranfar *et al.*, 2003). La acumulación de ARNm de *tgrC* es dependiente de GBF (*G-box binding transcription factor*) y tanto TgrC como GBF son necesarios para la correcta expresión de muchos genes post-agregativos (Iranfar *et al.*, 2006).

1.8.1.2 Adhesión célula-sustrato

Durante el crecimiento vegetativo, SadA (*substrate adhesion-deficient*) media la adhesión al sustrato. Es una proteína con dominios transmembrana y una región extracelular con características de integrinas y otras proteínas de adhesión. Su ausencia produce graves defectos en la adhesión al sustrato, citoquinesis, fagocitosis y organización de F-actina (Fey *et al.*, 2002). Durante el desarrollo, proteínas de la familia Sib (*similar to integrin β*) median principalmente la adhesión al sustrato. El miembro mejor caracterizado es SibA, con un dominio transmembrana y otro extracelular similares a los de β -integrina y un dominio citosólico que interacciona con talina, al igual que en mamíferos (Cornillon *et al.*, 2006).

1.9 REGULACIÓN DEL TAMAÑO EN *D. DISCOIDEUM*

Los mecanismos que subyacen a la regulación del tamaño constituyen una de las grandes preguntas de la biología evolutiva y del desarrollo (Bonner, 2006). En la mayoría de los eucariotas superiores el tamaño del individuo se regula controlando la tasa de división celular y el crecimiento celular; generalmente a través de los factores y hormonas del crecimiento, sus receptores o sus rutas de señalización (revisado en Gomer, 2001). *D. discoideum* representa un excelente modelo para este tipo de estudio (revisado en Jang y Gomer, 2008). En este organismo, aunque la multicelularidad se alcance por agregación en vez de por división celular, el tamaño necesita ser medido, comparado con un valor crítico y ajustado (revisado en Brown y Firtel, 2000; Jang y Gomer, 2008). Si el agregado o *mound* está formado por un número demasiado pequeño de células, el cuerpo fructífero resultante estará demasiado cerca del suelo y no podrá elevar las esporas lo suficiente para una correcta dispersión. Por el contrario, si en el agregado hay demasiadas células, el cuerpo fructífero será demasiado alto y colapsará por el peso del esporocarpio. Por lo tanto, la regulación del tamaño del cuerpo fructífero es esencial para la supervivencia de *Dictyostelium*.

Además de PSF y CMF, mencionados anteriormente, existen otros dos mecanismos principales que regulan el tamaño del territorio en *D. discoideum*; los pulsos de AMPc y el *Counting Factor* (CF).

1.9.1 Los pulsos de AMPc regulan el tamaño inicial del territorio

La amplitud de los pulsos de AMPc constituye el primer punto esencial de control del tamaño del territorio. Variaciones en la intensidad y frecuencia de los pulsos se traducen en dramáticos cambios en el tamaño del *mound* (Kesbeke y Van Haastert, 1988; Jang y Gomer, 2008). Una disminución del relé de AMPc por sobreexpresión de PdsA o por defectos en la secreción de su inhibidor, Pdi, dan lugar a la formación de territorios pequeños (Faure *et al.*, 1988; Adames *et al.*, 1994; Palsson *et al.*, 1997). Aunque una ligera disminución del pulso de AMPc en presencia de bajas concentraciones de PdsA (hasta 0,1 mg/mL), favorece el aumento del tamaño (Tang *et al.*, 2001). También el aumento del relé por exceso de AMPc tiene como resultado una disminución del tamaño del territorio (Thadani *et al.*, 1977; Tang y Gomer, 2008), probablemente por una desensibilización de los receptores CarA.

1.9.2 *Counting Factor*

El CF (*counting factor*) es un factor autocrino secretado por las células en ayuno que actúa una vez los centros de agregación se han formado y las células están ordenadas en *streams* en torno al centro del territorio. La concentración de CF es proporcional al número de células en el *stream* y, si éste supera un umbral, el CF secretado “rompe” los *streams* para formar subgrupos que darán lugar a cuerpos fructíferos de un tamaño más óptimo (Brock y Gomer, 1999). CF es un complejo proteico de ≈ 450 kDa formado por, al menos, cuatro componentes; *countin*; CF45-1; CF50; CF60 y se aisló a partir del medio condicionado del mutante *smlA*⁻ (*small aggregates*), que forma cuerpos muy pequeños y numerosos (Brock *et al.*, 1996; Brock y Gomer, 1999). Las cepas nulas para cada uno de los componentes *ctnA*⁻, *cf45-1*⁻, *cf50*⁻, no secretan CF activo y dan lugar a grandes agregados que no se rompen (Brock y Gomer, 1999; Brock *et al.*, 2002, 2003). El nulo de CF60 no se pudo obtener, lo que podría indicar que el gen es esencial (Brock *et al.*, 2006). CF modula el tamaño del territorio mediante la regulación de la adhesión célula-célula y la motilidad celular (Roissin-Bouffay *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002; Gomer *et al.*, 2002). CF disminuye la adhesividad celular disminuyendo los niveles de CadA y Csa (Roissin-Bouffay *et al.*, 2000) y aumenta la motilidad celular favoreciendo la reorganización del citoesqueleto actina/miosina a través de la translocación y activación de AKT/PKB (Gao *et al.*, 2004). El ratio adhesión/motilidad celular es lo que determina el tamaño del territorio, más que cada parámetro de forma independiente (Dallon *et al.*, 2005).

También se ha descrito que el CF aumenta la amplitud del pulso de AMPc inducido por AMPc y disminuye el de GMPc inducido por AMPc a través de una/s ruta/s no bien caracterizadas, pero se sabe que la regulación de la adhesión y motilidad celular la ejerce de manera independiente al AMPc (Tang *et al.*, 2001).

1.9.2.1 CF y glucosa

La glucosa está implicada en la regulación del tamaño a través de CF; los niveles de glucosa intracelular y CF están inversamente relacionados en *D. discoideum* (Jang *et al.*, 2002). Previamente ya se había descrito que células crecidas en alta concentración de glucosa (86 mM) daban lugar a cuerpos fructíferos más grandes (Garrod y Ashworth, 1972). El tratamiento de células en ayuno con, únicamente, 1 mM glucosa mimetiza el efecto de disminuir los niveles de CF, aumentando el tamaño del agregado, la adhesión célula-célula y disminuyendo la motilidad celular (Jang *et al.*, 2002). CF regula los niveles de glucosa mediante el control de la gluconeogénesis; concretamente regulando negativamente la actividad glucosa-6-fosfatasa, un enzima clave en la homeostasis de la glucosa que cataliza su síntesis a partir de glucosa-6-fosfato (Jang y Gomer 2005, 2006). Como consecuencia de esta inhibición, los niveles de glucosa disminuyen y los de glucosa-6-fosfato aumentan. Sin embargo se ha documentado que CF también regula a la baja los niveles de fructosa-1,6-bisfosfato, piruvato, lactato y ATP, así como la actividad de glucoquinasa (*glk*), por lo que los autores sugieren que CF también estaría regulando otra/s enzimas (Jang *et al.*, 2009).

1.9.2.2 Regulación del CF

No se han caracterizado los mecanismos que subyacen a la regulación transcripcional, ni de la actividad del CF. Pero sí se ha identificado IfkA, una eIF2 α -quinasa que regula positivamente la traducción de Countin (*ctnA*) (Fang *et al.*, 2003). En *D. discoideum* se han caracterizado dos eIF2 α -quinasas (IfkA e IfkB), proteínas que en mamíferos fosforilan los reguladores de la traducción eIF2 α que, a su vez, regulan la respuesta al ayuno de aminoácidos. IfkA fosforila eIF2 α durante las 7 primeras horas del desarrollo, reduciendo la síntesis proteica de forma general durante este periodo, salvo la de Countin, que la favorece. El nulo *ifkA*⁻ agrega de forma temprana y forma *mounds* y cuerpos fructíferos de mayor tamaño que el tipo silvestre. La agregación precoz es consecuencia de un establecimiento temprano de los pulsos de AMPc, con niveles de *acaA* y *carA* más elevados y prematuros, mientras que el aumento del tamaño es consecuencia de la menor cantidad de Countin presente en el mutante *ifkA*⁻ (Fang *et al.*, 2003).

1.10 PadA (*Prestalk A differentiation*)

1.10.1 El mutante *padA*⁻

El mutante *padA*⁻ se aisló, a partir de una batería de mutantes, por su incapacidad de expresar el marcador pre-tallo *ecmB* en respuesta al morfógeno DIF-1. La mutación *padA*⁻ codifica una proteína a la que le faltan los últimos 25 aminoácidos del carboxilo terminal, de un total de 301 (PadAD276). El mutante *padA*⁻ se describió como un mutante pleiotrópico y termosensible, al que la proteína trunca le confería función residual. A la T^a permisiva, 22°C, el mutante crece un 40% más lento que el tipo silvestre, se comporta como un *slugger* (se mantiene mucho tiempo en el estadio de *slug* antes de culminar) y forma cuerpos fructíferos pequeños, con 8 h de retraso. A la T^a restrictiva (27°C), *padA*⁻ consigue formar estructuras verticales aberrantes con un tallo retorcido y un disco basal engrosado, sin tallo ni esporas correctamente diferenciadas. Marcadores específicos de las regiones pre-tallo “pstA” y “pstB” demostraron que la diferenciación celular de estas regiones está comprometida en el mutante. La expresión del gen *padA* durante el desarrollo está regulada y se demostró la de-represión de los transportadores de amonio, *amtA* y *amtC* durante el desarrollo (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008).

1.10.1.1 PadA contiene un dominio tipo NmrA

Diversos análisis con programas estándar de similitud de secuencia establecieron que PadA pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio *Rossmann-Fold*, que se caracterizan por presentar dominios de unión a NAD⁺(H)/NADP⁺(H). Dentro de esta superfamilia, se englobó en la familia SDR (*Short Chain Dehydrogenase/Reductase*) (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Las SDR constituyen una extensa familia de enzimas que catalizan reacciones de oxidoreducción dependientes de NAD⁺(H)/NADP⁺(H). Es una familia muy heterogénea, con baja similitud de secuencia, pero alta similitud a nivel estructural y de plegamiento, excepto en el C-terminal, específico de cada substrato y característico de cada SDR. En el N-terminal se localiza el dominio *Rossmann-fold* (Kallberg *et al.*, 2002). La cristalización del co-represor transcripcional de *Aspergillus nidulans* NmrA incluyó, sorprendentemente, a PadA en la familia de las SDR (Stammers *et al.*, 2001) y diferentes programas de análisis y predicción de estructura indican que PadA puede ser un homólogo de NmrA (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). NmrA es un regulador transcripcional negativo, implicado en la represión por metabolito de amonio a través su interacción con el factor de transcripción tipo GATA, AreA (Andrianopoulos *et al.*, 1998). El dominio C-terminal de NmrA se une al factor GATA AreA impidiendo que éste induzca la transcripción de genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de

nitrógeno (Stammers *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2004). NmrA define la familia estructural *NmrA-like*, de la que existen homólogos a lo largo de toda la escala evolutiva, desde otros hongos (Fu *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 2007) y *Dictyostelium* (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010a; 2010b), hasta humanos (Zheng *et al.*, 2007). NmrA no es una SDR convencional, carece del residuo Tyr catalítico de las deshidrogenasas (Oppermann *et al.*, 2003; Stammers *et al.*, 2001), al igual que PadA (Fig. 13) (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). NmrA une NAD⁺ y NADP⁺ con prácticamente la misma afinidad ($\approx K_D$ 65 μ M) y discrimina entre formas oxidadas y reducidas, por las que no muestra apenas afinidad (Lamb *et al.*, 2003). El residuo conservado Thr14, en el dominio de unión a dinucleótido de PadA, es esencial para la función de la proteína (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). En el C-terminal de NmrA, compuesto por 2 láminas β y 5 α hélices (al igual que PadA), se localiza el dominio de interacción con factores GATA, que incluye tres residuos cargados HDV (Stammers *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2004), de los cuales la 174H y la 175V están conservadas en PadA (en las posiciones 178H y 179V). Mutaciones puntuales en estos residuos anulan la interacción con el factor AreA en NmrA (Kudla *et al.*, 1990; Lamb *et al.*, 2004) y esta región también es esencial para PadA (Núñez-Corcuera, 2008). Se desconoce el mecanismo por el que NmrA regula la actividad de AreA; algunos autores sugieren que NmrA bloquea la translocación al núcleo de AreA, reteniéndolo en el citoplasma en función del estado redox de la célula (Lamb *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha observado que la formación del complejo NmrA-AreA afecte a la afinidad, la unión ni a la discriminación de NmrA por los dinucleótidos (Lamb *et al.*, 2003). Los niveles transcripcionales de *areA* y *nmrA* están inversamente regulados y se ha identificado un factor de transcripción, MeaB, implicado en la regulación de NmrA (Wong *et al.*, 2007).

Recientemente se ha descrito un nivel adicional de regulación de NmrA a través de su proteólisis controlada. La concentración de NmrA presente en el núcleo de las células disminuye cuando éstas disponen únicamente fuentes no preferentes de nitrógeno, como nitrato, y disminuye casi por completo en condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno. Esta disminución está, en parte, regulada por la proteólisis mediada por tres proteasas y aparentemente la unión a NAD⁺ o NADP⁺ (en menor medida) protege a NmrA de posteriores procesos proteolíticos (Zhao *et al.*, 2010).

NMR1, el homólogo de NmrA en *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* y otros hongos, está regulado, en parte, por Tps1 (*trehalose-6-phosphate synthase*) en *M. grisea*. Este enzima es un regulador que integra el metabolismo del nitrógeno, el metabolismo del carbono y la expresión de genes de infección en *M. grisea*. Tps1 integra las dos vías metabólicas mediante la regulación de la disponibilidad de NADPH, controlando la actividad G6PDH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato (Wilson *et al.*, 2007).

G6PDH reduce NADP^+ para dar NADPH a costa de la deshidrogenación de glucosa-6-fosfato (G6P) (Tian *et al.*, 1998).

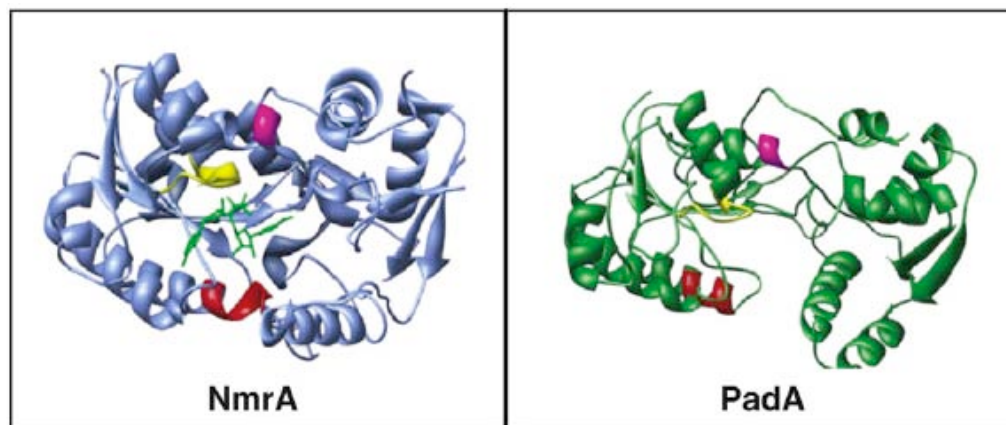


Figura 13. Modelo estructural propuesto para PadA. A la izquierda, la estructura de NmrA en diagrama de cintas, con el dominio de unión a cofactor en amarillo, la región catalítica no funcional, en rojo, y la de unión a factor GATA, en fucsia. El cofactor NAD, en verde. A la derecha el modelo estructural propuesto para PadA con los dominios funcionales conservados (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008).

1.10.2 HSCARG (NMRL-1:Human *NmrA*-like-1)

HSCARG (NMRL1) es el homólogo descrito de NmrA en humanos. La resolución del cristal reveló una topología similar a la de NmrA y la formación de un dímero asimétrico, con una molécula unida a $\text{NADP}^+(\text{H})$ y la otra libre de cofactor (Zheng *et al.*, 2007). En condiciones basales presenta una afinidad mucho mayor (360 veces) por NADPH que por su forma oxidada, NADP^+ (Zheng *et al.*, 2007) y la unión al cofactor reducido es esencial para la formación de un dímero estable (Dai *et al.*, 2009). El ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ intracelular es un indicador del estado redox de la célula, y está modulado por la reacción inicial de la ruta de las pentosas fosfato, mediada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). En condiciones basales, HSCARG está asociada a los filamentos intermedios, pero cuando el ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ disminuye, pasa a estar localizada de forma dispersa en citoplasma y núcleo (Zheng *et al.*, 2007). Se ha implicado a HSCARG en la regulación de la síntesis de óxido nítrico (NO) a través de la interacción con la arginino succinato sintetasa (AS), enzima limitante en los pasos finales de la síntesis de NO (Zhao *et al.*, 2008). Esta unión ocurre en función del ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$: cuando éste es alto, HSCARG une NADPH y dimeriza, sin embargo, cuando los niveles de NADPH disminuyen, la afinidad de HSCARG por AS aumenta y libera el NADPH para unirse al enzima (Zhao *et al.*, 2008). Así, en mutantes puntuales con el sitio de unión a NADPH anulado,

la interacción con AS es más fuerte (Dai *et al.*, 2009). La sobreexpresión de AS o sobreproducción de NO induce una sobreexpresión de HSCARG a nivel de mensajero y una translocación al núcleo de la misma, a pesar de que ni HSCARG ni AS tienen una secuencia de localización nuclear (Zheng *et al.*, 2007).

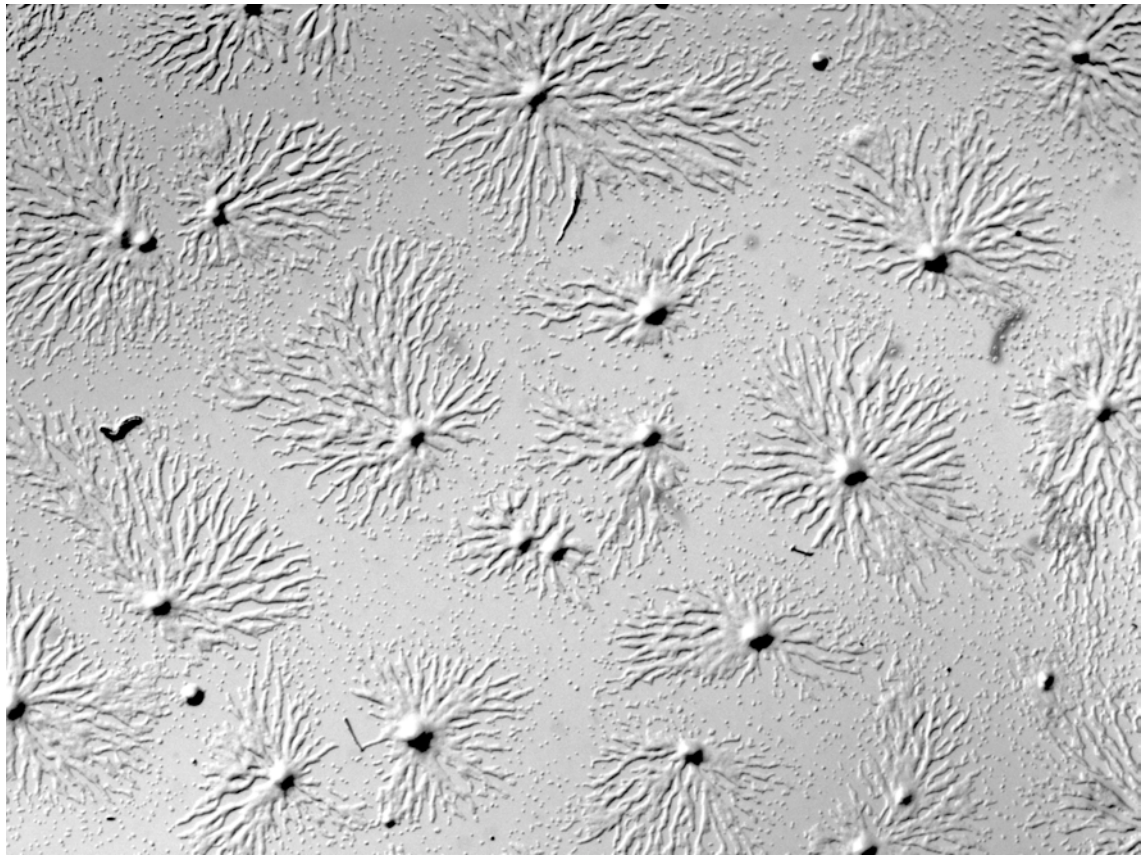
HSCARG también regula la actividad transcripcional del complejo NF- κ B y su translocación al núcleo en líneas celulares humanas a través de dos vías (Gan *et al.*, 2009; Lian y Zeng, 2009). NF- κ B (*nuclear factor κ B*) es un factor de transcripción que regula la expresión génica de procesos biológicos clave, como la apoptosis o la inflamación, entre otros (Ghosh *et al.*, 1998). En su forma inactiva, el heterodímero NF- κ B está retenido en el citoplasma por las proteínas I κ B, que ante un estímulo inflamatorio como la presencia de TNF α o IL-1 β , son fosforiladas y se degradan para liberar NF- κ B y permitir su translocación al núcleo (Gan *et al.*, 2009). Por una parte, HSCARG regula negativamente esta vía, uniéndose a IKK β e impidiendo la fosforilación y degradación de I κ B α (Gan *et al.*, 2009). Por otro lado, a través de un ensayo de doble híbrido, se ha demostrado que HSCARG interacciona con COMMD (*copper metabolism gene MURR1 containing protein 1*), un inhibidor de NF- κ B que promueve su ubiquitinación y degradación vía proteosoma (Lian y Zeng, 2009). Estos datos ponen de manifiesto la implicación de HSCARG en la regulación de una proteína central para la homeostasis celular como NF- κ B.

Además de PadA, otras 8 proteínas en el genoma de *D. discoideum* contienen dominios *NmrA-like*. Se ha resuelto el cristal de dos de ellas, DDB_G0291732 y DDB_G0286605 (Kim *et al.*, 2010a, 2010b), aunque todavía no se han caracterizado por completo.

1.10.3 MTF (*Metabolic Transcription Factors*)

PadA se enmarcaría en una nueva clase de reguladores, capaces de detectar el estado metabólico de la célula y acoplarlo a la transcripción génica (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). El metabolismo y la regulación de la expresión génica son dos actividades celulares esenciales en todos los organismos. Hasta ahora, la transcripción génica en respuesta a cambios en el estado metabólico de la célula se entendía como cambios post-traduccionales en los factores de transcripción a través de cascadas de señalización. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de una serie de enzimas metabólicos, con dominios de unión a cofactores metabólicos (NAD, NADP, FAD, CoA, HEME, SAM, UDP-GlcNAc) que relacionan de forma directa el estado metabólico y la transcripción (Shi y Shi, 2004). Estos enzimas reguladores se denominan genéricamente MTF (*Metabolic Transcription Factors*) y forman un grupo heterogéneo donde las proteínas, pueden o no tener actividad enzimática, y son capaces de modificar la actividad/función de factores de transcripción, en función de la disponibilidad de un cofactor metabólico (Shi y Shi, 2004). Un ejemplo de este tipo de regulación es el que

ejerce Sir2 (*Silence Information Regulator*; homólogo de las sirtuínas en mamíferos) sobre la transcripción génica relacionada con el envejecimiento y la longevidad (Guarente *et al.*, 1999). Sir2 es una deacetilasa de histonas dependiente de NAD, por lo que las fluctuaciones en los niveles de NAD y su disponibilidad determinan el nivel de acetilación de las histonas y por lo tanto la regulación sobre la transcripción génica (Imai *et al.*, 2000 revisado en Blander y Guarente, 2004).



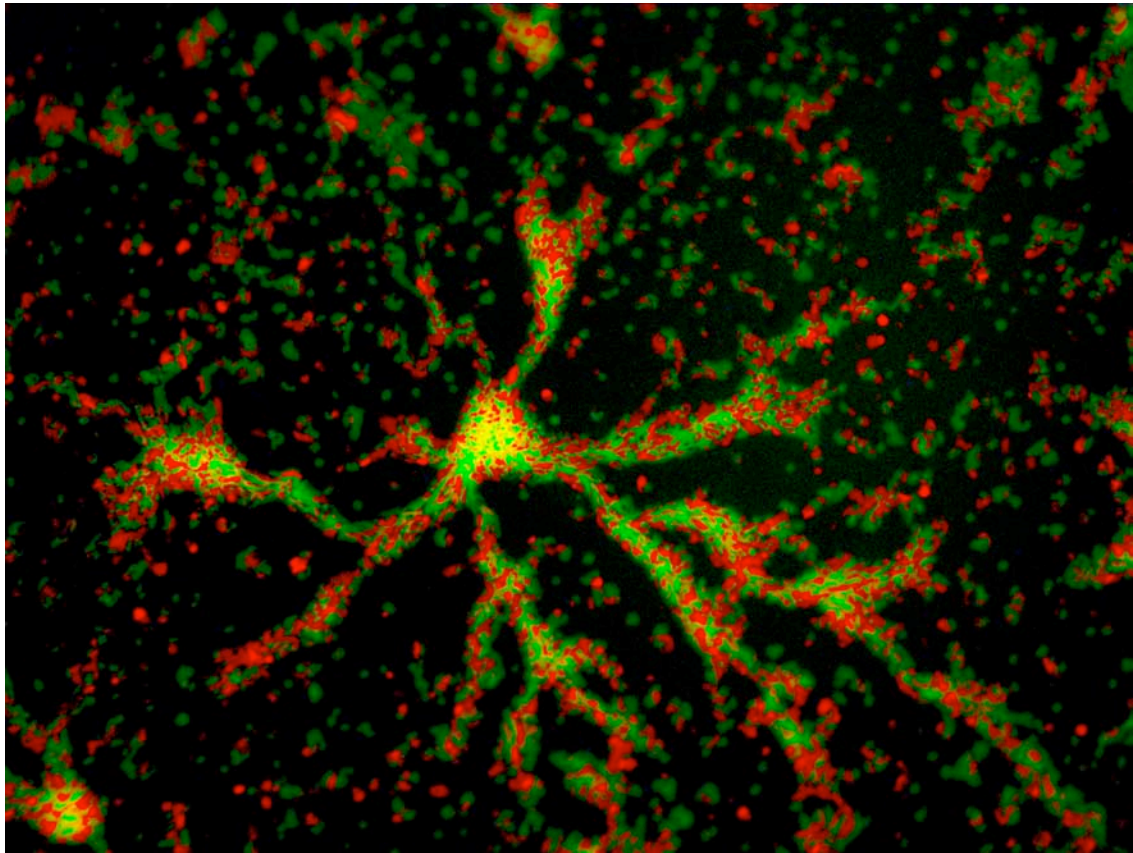
2

Objetivos

El objetivo principal del trabajo presentado en esta tesis es la caracterización de la función de la proteína PadA en el crecimiento vegetativo y el desarrollo temprano de *Dictyostelium discoideum*.

Para ello se han fijado cuatro objetivos concretos:

1. Generar un anticuerpo que permita detectar la proteína PadA, para analizar su presencia en el mutante y validar el modelo estructural propuesto.
2. Definir la posición filogenética de PadA entre las proteínas *NmrA-like* de *D. discoideum*, NmrA de *Aspegillus nidulans* y NMRAL1 de humanos para determinar si PadA es el homólogo de NmrA en *D. discoideum*.
3. Analizar la función de PadA durante el crecimiento vegetativo de *D. discoideum* mediante micromatrices de ADNc en diferentes medios y el comportamiento del mutante en distintas condiciones.
4. Caracterizar rigurosamente el defecto de *padA*⁻ durante el proceso de agregación y definir el blanco molecular de la acción de PadA.



3 Material y Métodos

3.1 CEPAS DE *D. DISCOIDEUM* EMPLEADAS

3.1.1 Cepa silvestre y cepas construídas en el laboratorio

La cepa silvestre de *D. discoideum* que se utilizó a lo largo de todo el trabajo es **AX2** (*axenically grown strain-2*, Watts y Ashworth, 1970). Las esporas de AX2 se mantuvieron adsorbidas en cristales de gel de sílice y conservadas a -20°C. Cada tres semanas se refrescó la cepa, depositando 3-6 cristales de sílice sobre un césped de bacterias (*Klebsiella aerogenes*) para obtener así amebas en crecimiento activo que se cultivaban posteriormente en un medio líquido axénico.

La cepa mutante ***padA*⁻** (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008) es el objeto de estudio de esta tesis. Alícuotas de amebas de *padA*⁻ se conservaron congeladas a -80°C en suero de caballo inactivado (Horse Serum, heat inactivated. Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) mezclado con 7% de DMSO (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.). Esta cepa se refrescó cada semana y se seleccionó con 5 µg/mL de blasticidina (InvivoGen. San Diego, EE.UU.).

A continuación se describen otras cepas construidas por B. Núñez-Corcuera y T. Suárez (Núñez-Corcuera, 2008) en los fondos AX2 y *padA*⁻, y que han sido empleadas en el presente trabajo. Todas fueron seleccionadas con G-418 (Gibco-Invitrogen. EE.UU.); con 5 µg/mL el fondo genético *padA*⁻ y con 20 µg/mL AX2 y expresan las siguientes construcciones.

AX2/A15::*padA*: Cepa AX2 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la secuencia codificante de 920 pares de bases de *padA*.

padA*⁻/A15::*padA: Cepa *padA*⁻ que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la secuencia codificante de 920 pares de bases de *padA*.

AX2/A15::*padAD276*: Cepa AX2 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la secuencia truncada del gen *padA* (826 pares de bases).

***padA*⁻/A15::*padAD276*:** Cepa *padA*⁻ que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la secuencia truncada del gen *padA* (826 pares de bases).

***padA*⁻/A15::*padAT18V*:** Cepa *padA*⁻ que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, el alelo *padAT18V* (mutación puntual en el sitio de interacción con el cofactor NAD⁺ (H)/NADP⁺ (H)).

***padA*⁻/A15::*padAH178A/D179N*:** Cepa *padA*⁻ que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, el alelo *padAH178A/D179N* (mutaciones puntuales en el sitio conservado de interacción con factores GATA).

AX2/A15::*GFP*: Cepa AX2 que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la fusión traduccional de la proteína verde fluorescente a la región amino terminal de PadA.

***padA*⁻/A15::*RFP*:** Cepa *padA*⁻ que expresa constitutivamente, bajo el promotor actina 15, la fusión traduccional de la proteína verde fluorescente a la región amino terminal de PadA.

3.1.2 Cepas cedidas por otros laboratorios.

***cnrN*⁻:** Cepa nula para el gen *cnrN* cedida por el Dr. R. Gomer (A&M University, Texas, EE.UU.). Construida en el fondo AX2 (Tang y Gomer, 2008).

3.2 OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA PCR

3.2.1 Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica

Los cebadores han sido diseñados con la ayuda del programa NETprimer (www.premierbiosoft.com; Premier Biosoft International. California, EE.UU.). La mayoría flanquean amplicones de entre 150-400 pares de bases y tienen una temperatura de fusión de entre 54-63°C (excepto los de *padA*, que amplifican un inserto de 550 bp y sus T_m son más bajas, 51 y 54°C respectivamente).

Tabla 1. Secuencias de cebadores empleados para RT-PCR semi-cuantitativa y cuantitativa.

Gen	ID Gen		Secuencia cebador
<i>acaA</i>	DDB_G0281545	Sentido 5' - 3'	AATGAGCCAATTTACCCAAGAG
		Antisentido 5' - 3'	ATGCAATCCAATGCTCAAGATAATG

Gen	ID Gen		Secuencia cebador
cadA	DDB_G0285793	Sentido 5' - 3'	CCAAGTCTTACCAGGAGCTTTTC
		Antisentido 5' - 3'	GGGAATGTCTCATCTTTTTTAATAACTG
carA	DDB_G0273397	Sentido 5' - 3'	ATGATGATAAAGAAGATGAAGATGAACC
		Antisentido 5' - 3'	CCAGCACTCAATATTCTCC
cbpA	DDB_G0276759	Sentido 5' - 3'	CAGATGCAATTGCTCCACTTATG
		Antisentido 5' - 3'	GATTTATGTTTTAGAGGGTCTTG
cf50	DDB_G0273175	Sentido 5' - 3'	CAAGAAGCTGTTGAACTGCAC
		Antisentido 5' - 3'	CATAAAAATCTAAATCAACACTAACACC
cmfA	DDB_G0275007	Sentido 5' - 3'	GTGCTGTAGGTGTTGGTTGTTCTG
		Antisentido 5' - 3'	CACCTTCGAGTGGAGTATGCTC
csA	DDB_G0289073	Sentido 5' - 3'	CAGGTATCTTTTTAAACAATGCCC
		Antisentido 5' - 3'	CTGTTTCAGTTGGAGTTGGAGATG
ctnA	DDB_G0274597	Sentido 5' - 3'	GCTTTCAATATCATCGATCCAAC
		Antisentido 5' - 3'	CCAGCACCAGACATTGATGAAG
dia2	DDB_G0291253	Sentido 5' - 3'	CAGTTGCTCATGTTGAAGTATTTG
		Antisentido 5' - 3'	GTTTGGAATAACTTGATATAATTTTC
dscA	DDB_G0273063	Sentido 5' - 3'	GTAAACGTGAAGTTGTTGTCCCAG
		Antisentido 5' - 3'	CAAAGCGGTAGCAATGTAATCAG.
gcA	DDB_G0275009	Sentido 5' - 3'	CAACGAAGATGATGAAAGCTC
		Antisentido 5' - 3'	GCCCAATTACCGTCTTCATC
glk	DDB_G0287631	Sentido 5' - 3'	GTAGCCGCCTCTTCAATCG
		Antisentido 5' - 3'	CAAATAAACTGGGGCTAAATG
gpaB	DDB_G0276267	Sentido 5' - 3'	CGAAAGAGCCTCAAATATATCAAAG
		Antisentido 5' - 3'	CAGCTTCAAAAACGACACG
ifkA	DDB_G0272837	Sentido 5' - 3'	CGCAACATTTAGTGGAGGTAGC
		Antisentido 5' - 3'	GAGTTTTCTTTGCTTACACGCTG
padA*	DDB_G0286385	Sentido 5' - 3'	GTTGATAGAGTTTTCTTAATTGC
		Antisentido 5' - 3'	GAAAGTTTATCTTCACGAGCAG
pdeD	DDB_G0274383	Sentido 5' - 3'	GGTTGTTTGGTTGCTGAAGG
		Antisentido 5' - 3'	CAAGAAATGCTAATTGAATACCAG
pdiA	DDB_G0277863	Sentido 5' - 3'	GCGATGATAATGATCCATGTACTG
		Antisentido 5' - 3'	GTTGGCCATGTATTAATAATCAATGTAC

Gen	ID Gen		Secuencia cebador
pdsA	DDB_G0285995	Sentido 5' - 3	CCATTATTATTGCTTCTTTTAATTGTTG
		Antisentido 5' - 3	ATCCTCTGTCGCTTGTGATTGG
regA	DDB_G0284331	Sentido 5' - 3	GAAGTTGAAGTTAAAGGAGCGGTGCG
		Antisentido 5' - 3	CCAAAACCACAAGAGCAAGAATCG
rnIA	DDB_G0294034	Sentido 5' - 3	GACCACTAGGCAGACTATGAGC
		Antisentido 5' - 3	ATATCAGCATTCTTAATTCCG
sibA	DDB_G0287363	Sentido 5' - 3	GGTTCTTATCGTCTCAAAGTATTGCG
		Antisentido 5' - 3	TTTGTAGAGACAGCACCATCAGC
sibB	DDB_G0288103	Sentido 5' - 3	GTGAAAAAGATGAAACTGTTGTACC
		Antisentido 5' - 3	TTTTCCACATAGCGGCAGC
tgrC	DDB_G0280531	Sentido 5' - 3	CTTTGACTAACGTTTGGTGATGG
		Antisentido 5' - 3	GTGGTTATAGTTTTACAGATATTCTCAATG
yakA	DDB_G0283605	Sentido 5' - 3	GATACTCCTTCTCTCATGATGTCACC
		Antisentido 5' - 3	CTCTCTATATGAACCAATAACAACCTG

Promotor	ID Gen		Secuencia cebador
pdsA agg.	DDB_G0285995	Sentido 5' - 3	AATTTGTAATTTTAAATACCAACTTCAATTCC
		Antisentido 5' - 3	GGTTGGTTGGTTGATTATTTTTGG
carA "early"	DDB_G0273397	Sentido 5' - 3	TCAAATTATTTCCAATAGGC
		Antisentido 5' - 3	GATTTCCATCTAAAAGACCC
acaA pr1**	DDB_G0281545	Sentido 5' - 3	CGTTTTTGATACGAATTCTTGGATC
		Antisentido 5' - 3	GGAGATCTACCACCACCATTTCATCATG
acaA pr2**	DDB_G0281545	Sentido 5' - 3	CCTCACTTCATAAATATATCTTTG
		Antisentido 5' - 3	GGAGATCTACCACCACCATTTCATCATG

* Cebadores diseñados previamente por la Dra. Suárez. (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008).

** Cebadores cedidos por el Dr. Sastre (Galardi-Castilla *et al.*, 2010).

Tabla 1. Secuencia de los cebadores sentido y antisentido empleados en el análisis de la expresión génica por PCR semi-cuantitativa y RT-PCR cuantitativa en tiempo real. También se indica el número identificador de cada gen analizado (www.dictybase.com).

3.2.2 Oligonucleótidos utilizados para la construcción del vector plasmídico para la expresión de la proteína PadA

Tabla 2. Secuencias e cebadores empleados para el clonaje del amplicón *padA*.

Cebador	Vector	Secuencia cebador
TS 39	<i>padA</i> en pET19	GGAAGATCTATGCAAACAAATATTACTTCAACAAAAATGTC
TS 84	<i>padA</i> en pET19	TGCCATCGAATTTACTGTCC
TS 94	<i>padA</i> en pET19	CCAGATCTTTATATAACTGGTTTAGAAGTACAACACTACC
TS 228	<i>padA</i> en pET3	GGCATATGCAAACAAATATTACTTCAAC
TS 229	<i>padA</i> en pET3	GGAGATCTTTATATAACTGGTTTAGAAGTACAAC

Tabla 2. Secuencia de los cebadores sentido y antisentido empleados para el clonaje del amplicón *padA* en los vectores de expresión de proteínas pET3a y pET19.

3.3 VECTORES Y CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

3.3.1 Vectores comerciales

pET-19 (Novagen-Merck. Darmstadt, Alemania). Este vector de expresión proteica tiene una secuencia de 10 aminoácidos histidina en el sitio de múltiple clonaje donde se inserta el amplicón. De manera que al expresar la proteína de interés la cola de residuos de histidina esté en el amino terminal de la proteína.

pET-3a (Novagen-Merck. Darmstadt, Alemania). Vector de expresión proteica con la secuencia T7-tag® (los primeros 11 aminoácidos del gen 10 del fago T7) en el amino terminal.

3.3.2 Construcciones plasmídicas obtenidas del “Stock Center” de *dictybase*

pCAR1-B18: Plásmido (pB18) que dirige la expresión constitutiva de la secuencia codificante del gen *carA* (A15::*carA*). Depositado por el Dr. P. Devreotes (ID del plásmido en *dictybase*: 70)

pKL2: Plásmido (pB18) que dirige la expresión constitutiva de la secuencia codificante del gen *acaA* (A15::*acaA*). Depositado por la Dra. C. Parent (ID del plásmido en *dictybase*: 450).

3.3.3 Construcciones plasmídicas cedidas por otros investigadores

***acaAPr1::ile-gal*.** Fusión de la región correspondiente al promotor 1 (de agregación) de *acaA* al gen de la β -galactosidasa lábil. Construcción cedida por el Dr. Sastre (Galardi-Castilla *et al.*, 2010).

***acaA::ile-gal**.** Fusión del promotor de *acaA** al gen de la β -galactosidasa lábil. Construcción cedida por la Dra. P. Schaap. Este promotor de *acaA* se definió a partir de un clon genómico (Verkerke-Van Wijk *et al.*, 2001), que se demostró que contenía una delección interna que abarcaba parte del promotor 2 y 3 de *acaA* y no se correspondía con el promotor real. El patrón espacial de expresión de este promotor es muy similar al del promotor 3 (Galardi-Castilla *et al.*, 2010).

***pdsA Prlate::ile-gal*.** Fusión del promotor “late” (tardío) de la fosfodiesterasa extracelular PdsA al gen de la β -galactosidasa lábil. Construcción cedida por la Dra. P. Schaap (Weening *et al.*, 2003)

3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1 Extracción de ADN

3.4.1.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de *D. discoideum* se extrajo con el *kit* comercial “Gene-Elute mammalian genomic DNA extraction Mini Kit” (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Se empleó un número de células por columna 5 veces mayor que el recomendado para obtener la máxima cantidad de ADN.

3.4.1.2 Extracción de ADN plasmídico

El aislamiento del ADN plasmídico se realizó con el *kit* comercial “High pure plasmid DNA isolation *kit*” (Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania) y para obtener mayor cantidad de ADN (hasta 500 μ g) para transfectar *D. discoideum* se empleó el *kit* “illustra Plasmidprep Midi Flow Kit” (GE Healthcare. Buckinghamshire, UK).

3.4.2 Extracción de ARN

El ARN, tanto de células como de estructuras del desarrollo de *D. discoideum*, se extrajo con el *kit* comercial “illustra RNAspin Mini Isolation Kit” (GE Healthcare. Buckinghamshire, UK) siguiendo las recomendaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Se empleó un número de células 5 veces mayor al recomendado.

3.4.2.1 Extracción de ARN del desarrollo temprano

Se extrajo el ARN de estructuras del desarrollo temprano de AX2 y *padA*⁻ lisando las estructuras depositadas sobre los filtros de nitrocelulosa en el tampón de lisis del *kit* “illustra RNAspin Mini Isolation Kit”. Se procedió a realizar la extracción según las recomendaciones del fabricante.

3.4.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

3.4.3.1 Tratamiento del ARN total con ADN-asa

Se visualizaron ≈ 500 ng del ARN total en un gel de agarosa del 1,2 % para comprobar su integridad. ≈ 2 μ g del ARN se trataron con 1 unidad de ADN-asa “Deoxyribonuclease I Amplification Grade” (Invitrogen. Carlsbad, EE.UU.) durante 30 min (el doble de tiempo que el indicado por el fabricante). 0,5 μ l del ARN tratado (≈ 100 ng) se emplearon para la amplificación de un gen calibrador (*rnIA*) por PCR convencional. La ausencia de amplicón en esta reacción permitía comprobar la eficiencia de la digestión del ADN residual y continuar con la síntesis de ADN complementario. La enzima se inactivó con EDTA y calor según las instrucciones del fabricante antes de la transcripción reversa.

3.4.3.2 Transcripción reversa del ARN total con cebador Oligo (dT)₁₂₋₁₈

El ARN total libre de ADN de la reacción anterior, (9,5 μ l; ≈ 1900 ng de ARN total) se sometió a transcripción reversa con el enzima “SuperScript™ II Reverse Transcriptase” (Invitrogen. Carlsbad, EE.UU.) y 0,5 μ g Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen. Carlsbad, EE.UU.) como cebador siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc generado se empleó para diversos estudios transcripcionales.

3.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN para los clonajes se realizó con un protocolo basado en Sambrook y colaboradores (1989) con la polimerasa de ADN de alta fidelidad “Taq DNA Polymerase” (Invitrogen. Carlsbad, EE.UU.). En el clonaje de *padA* en el vector pET-3a se

empleó la “Expand High Fidelity PCR system” (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las amplificaciones para el análisis por PCR semi-cuantitativa y otras reacciones rutinarias se realizaron con la mezcla comercial “5Prime mastermix” que lleva incorporado todo lo necesario a excepción de los cebadores y el ADN molde (5 Prime. Hamburgo, Alemania). En este caso siempre se añadió 1 mM final de $MgCl_2$ para optimizar la reacción. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). La temperatura de anillamiento varió en función de la pareja de cebadores, pero la de extensión fue siempre de 68°C, debido al alto contenido en A y T del genoma de *D. discoideum*.

3.4.4.1 RT-PCR semi-cuantitativa

Los genes cuya expresión se analizó por RT-PCR semi-cuantitativa se muestran en la Tabla 1, con los cebadores empleados y el ID del gen. Los cebadores se diseñaron cercanos al extremo 3' del gen, porque es la región que primero se retrotranscribe con el Oligo-dT y así disminuye la posibilidad de que la transcriptasa reversa “se despegue” y no se haya sintetizado el ADNc de esa región. La cantidad de ARN empleada para la amplificación de estos genes osciló entre 76 y 237,5 pg en un volumen final de 25 μ L y se normalizó con el gen que codifica la subunidad ribosomal grande del ADN mitocondrial, *rnlA*, cuya expresión no varía a lo largo del desarrollo. Para el análisis transcripcional del gen *padA* tuvieron que emplearse cantidades mayores de ARN, entre 1,5 y 10 ng, debido a su bajo nivel de expresión. El programa de amplificación constaba de una desnaturalización inicial de 40 s a 95°C, 30 ciclos con una desnaturalización de 20 s a 95°C, una amplificación de 40 s a la temperatura correspondiente a cada pareja de cebadores y una extensión de 50 s a 68°C, además de la extensión final de 12 min. Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa (Agarose D1 Low. Laboratorios Conda. Madrid) de entre 1-1,5% (p/v) (dependiendo del tamaño del amplicón) y la señal se fotografió tras 10 min de tinción en 10 mg/mL bromuro de etidio con una cámara acoplada al transiluminador (Bio-Rad. California, EE.UU.).

3.4.4.2 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Para el análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real se emplearon los mismos cebadores diseñados para el análisis semicuantitativo. El estudio se llevó a cabo con la mezcla comercial iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad. California, EE.UU.) que contiene una Taq polimerasa (iTaq DNA polymerase), 6 mM $MgCl_2$, SYBR Green I, fluoresceína y estabilizadores. La reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L donde además de la mezcla iQ™ SYBR® Green Supermix (2X) se añadieron los cebadores sentido y antisentido a 160 mM final y 1 μ L del ADNc objeto de estudio. La dilución del ADNc empleada varió en función del gen analizado; para el

gen calibrador, *rnlA*, el ADNc se diluyó 500 veces, para el resto de los genes, 100 veces y para el estudio de los promotores, 20 veces. Además de las reacciones de interés se diseñó una curva patrón para analizar la especificidad de la amplificación de los cebadores. Para ello se dispusieron diluciones seriadas ($1-1 \times 10^{-5}$) de un ADNc incluído en el análisis que expresara el gen de interés en niveles detectables. Las reacciones se dispusieron según recomendaciones del fabricante sobre una placa de 96 pocillos, (iQ 96-Well PCR Plate. Bio-Rad. California, EE.UU.) donde cada reacción se analizó por duplicado. Se incluyó un control negativo donde no se añadió ADNc (NTC: no template control) para cada pareja de cebadores. El programa de amplificación constaba de una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C y 40 ciclos con la misma T^a de desnaturalización, anillamiento de 30 s a la temperatura específica para cada pareja de cebadores y una extensión de 50 s a 68 °C, además de una extensión final de 5 min a 68 °C. La reacción se llevó a cabo en el termociclador “iQ5 Real Time PCR Detection System” (Bio-Rad. California, EE.UU.). El análisis de cuantificación relativa, donde se analizó la cantidad relativa de un amplicón en la cepa problema (*padA*) respecto a la cepa control (AX2) normalizándola con la del gen calibrador (*rnlA*) se realizó con el *software* CFX Manager (Bio-Rad. California, EE.UU.). El método de cuantificación relativa que mejor se ajustó a las muestras fue el de Pfaffl (Pfaffl, 2001), y también el ΔCT (variante del método *Livak*), que es el que se muestra a lo largo de este trabajo.

3.4.4.3 Purificación de fragmentos de PCR

Las purificaciones de los amplicones para eliminar los cebadores se han realizado con el *kit* “Jet Quick PCR purification spin kit/50” (Genomed, Alemania) según las recomendaciones del fabricante.

3.4.5 Clonajes

3.4.5.1 Digestión con endonucleasas de restricción

Las digestiones de los fragmentos de ADN se llevaron a cabo con enzimas de restricción de New England Biolabs (NEB Inc. Ipswich, EE.UU.) siguiendo las pautas establecidas por el fabricante.

3.4.5.2 Reacción de ligación

Las ligaciones se realizaron con el enzima “T4 DNA ligase” de Fermentas (Thermo-Scientific. Waltham, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4.5.3 Transformación de bacterias

3.4.5.3.1 Bacterias competentes

Las transformaciones se realizaron rutinariamente con la cepa de bacterias competentes *Escherichia coli* “XL-10 gold” (Stratagene, EE.UU.). El protocolo que se siguió fue el de la transformación por choque térmico establecida por Sambrook y colaboradores (1989).

3.4.5.3.1.1 Bacterias para expresión proteica

Para la expresión de la proteína *his-PadA* clonada en pET 19 se ha utilizado la cepa *E.coli* “BL21 DE3 pLysS” (Novagen, Darmstadt, Alemania) y para la expresión de PadA clonada en pET3-a se empleó la cepa *E.coli* “BL21 DE3”.

3.4.6 Secuenciación de ADN

La secuenciación del material genético se realizó en *Secugen*, servicio de secuenciación de ácidos nucleicos ubicado en el Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid (www.secugen.es).

El análisis informático de las secuencias se llevó a cabo con diferentes programas:

“4 peaks” 1.5 (www.mekentosj.com/science/4peaks) para el análisis de las secuencias, y “ClustalW” 1.81 para la comparación y alineamiento de secuencias (www.clustalw.ebi.ac.uk).

La base de datos del genoma de *D. discoideum* se ubica en *dictybase* (www.dictybase.com).

3.5 OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-PADA

3.5.1 Purificación de la proteína PadA

3.5.1.1 Clonaje de la proteína PadA en pET19 y transformación de *E.coli* BL21

La secuencia codificante del gen *padA* de 920 pares de bases se amplificó a partir del ADN codificante de *D. discoideum* con los cebadores TS39 y TS94. El fragmento de PCR purificado se digirió con la endonucleasa de restricción *Bgl II*, para clonarlo en el vector de expresión pET19 que se había digerido previamente con *BamHI*. Se transformaron bacterias competentes con el resultado de la ligación y a partir de las colonias transformantes se aisló el plásmido. Para comprobar que el ADN plasmídico portaba la construcción correcta se envió a secuenciar con los oligonucleótidos TS39, TS94 y TS84, y se comprobó que la secuencia era correcta y que estaba en fase. Se transformó la cepa *E.coli* BL21 DE3 pLysS con la construcción pET19/PadA para la expresión de la proteína.

3.5.1.2 Inducción de la proteína PadA en *E.coli* BL21 DE3 pLysS

Los transformantes crecieron a 37°C en 1L de LB seleccionados con 34 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de ampicilina. Se mantuvieron en agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica de DO₆₀₀ 0,6. Se tomó una muestra como control no inducido y se añadió 0,1 mM isopropil-β-D-thiogalactósido (IPTG) (Sigma-Aldrich. St Louis, EE.UU.) para inducir la expresión de la proteína. Se indujo el cultivo durante 3 horas y se tomaron muestras cada hora para comprobar que la inducción se había producido. Para confirmarlo, se rompió el mismo volumen de cada muestra en un tampón de carga para desnaturalizar proteínas (20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glicerol, 2% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,01% (p/v) azul de bromofenol y 2% (p/v) SDS), se incubaron a 95°C 10 min y se fraccionaron en un gel de poliacrilamida del 12% (p/v) a 90 V durante 1,5 horas. El gel se embebió en tinción de *Coomassie* (0,025% (p/v) azul de *Coomassie*, 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético) durante 10 min y se eliminó el exceso de azul con una solución de desteñido (40% metanol, 7% ácido acético). Se comprobó la presencia de la proteína inducida del tamaño esperado de 37 kDa (33 kDa de PadA sumados a la cola de diez residuos de histidina). Se probaron diferentes concentraciones de IPTG para optimizar la inducción de his-PadA: 0,1 mM, 0,3 mM y 0,4 mM, pero no se observó mejoría en la inducción. Se centrifugó el cultivo inducido (centrífuga Sorvall RC 5C PLUS rotor SLA 1500) a 4°C y 6000 rpm durante 5 min. El *pellet* de bacterias se lavó en tampón 50 mM Tris HCl, 2 mM EDTA pH 8 y tras una nueva centrifugación se congeló a -80°C para favorecer la ruptura de las bacterias al descongelarlas.

3.5.1.3 Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC)

Las bacterias se descongelaron y se resuspendieron en 20 mL de una solución tampón (5 mM Imidazol 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9). Las bacterias se lisaron por sonicación para obtener una mezcla homogénea que se centrifugó. Sobrenadante y *pellet* se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (12% p/v) y se comprobó que la proteína estaba mayoritariamente en la fracción soluble, aunque una parte se había acumulado en cuerpos de inclusión y aparecía en el *pellet*. La purificación se realizó a partir de la fracción soluble según el protocolo del fabricante, en una columna de purificación con resina “His-Bind® metal chelation resin” (Novagen-Merck. Darmstadt, Alemania). Esta resina aloja cationes de Ni²⁺ a los que se une la cola de residuos de histidina acoplada a la proteína. Todos los tampones que se utilizaron en este proceso contenían diferente concentración de imidazol, análogo de la histidina. El extracto bacteriano al que se había añadido 5 mM de imidazol se pasó por la columna y la baja concentración de imidazol hizo que las histidinas unidas a PadA se unieran

covalentemente a los cationes de la resina. Se pasó un gradiente creciente de imidazol para ir eliminando la unión no específica hasta eluir la proteína his-PadA con 1 M de imidazol.

Se purificó un total de 980 µg de proteína para cuya elución se añadió urea 6 M, porque la proteína PadA concentrada precipitaba con mucha facilidad, y la única manera de solubilizarla fue utilizar un agente caotrópico como la urea.

3.5.1.4 Cuantificación de la proteína purificada

Debido a la presencia de urea 6 M y de imidazol 1 M en las fracciones proteicas recogidas, fue imposible realizar la cuantificación con los métodos habituales como Bradford o Lowry (Bradford *et al.*, 1976; Lowry *et al.*, 1951), debido a que estos compuestos interfieren en la lectura de los reactivos. Como el objetivo era inmunizar un conejo y las cantidades de proteína que se le inyectaran no requerían exactitud, la estimación se hizo por SDS-PAGE, comparando visualmente la intensidad de las bandas de las muestras con las de un patrón de albúmina de suero bovino (BSA) cuya concentración se conocía.

3.5.2 Inmunización de un conejo con la proteína his-PadA

La inmunización se realizó sobre un individuo hembra de conejo (*Orhyctolagus cuniculus*, raza *New Zealand White*), según protocolo estandarizado del animalario del Centro de Investigaciones Biológicas y bajo la supervisión del Sr. Moreno. Se llevó a cabo mediante 4 tandas de administración con diferentes cantidades de proteína purificada y un intervalo de 3 semanas entre los pinchazos. La primera dosis de proteína para la inmunización fue de 310 µg de proteína homogeneizados (1:1) con coadyuvante de *Freund* completo (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) para aumentar la respuesta inmune en el conejo. Las tres siguientes dosis se administraron con la proteína homogeneizada en coadyuvante de *Freund* incompleto (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) y las cantidades fueron 150 µg, 150 µg y 170 µg respectivamente.

Tras el período de inmunización, el personal del animalario extrajo 50 mL de sangre del conejo. Se mantuvo a 4°C durante una noche y se separó el suero del resto de la sangre por centrifugación a 4°C, 900 x g y 15 min. El suero se conservó a -80°C.

3.5.3 Optimización del suero anti-PadA

Dado que el suero Anti-PadA generado revelaba bandas inespecíficas, se emplearon diferentes técnicas para enriquecer el suero en la fracción de inmunoglobulinas que específicamente reconoce la proteína PadA. Fundamentalmente, se siguieron las siguientes estrategias de sustracción.

3.5.3.1 *Sustracción del suero con extracto proteico de E. coli BL21 DE3 pLysS*

Esta práctica se llevó a cabo para eliminar del suero aquellas inmunoglobulinas que reconocen epítomos propios de *E. coli* “BL21 DE3 pLysS”, cepa donde se expresó la proteína PadA. Cuatro membranas idénticas con distintas cantidades de extracto proteico de AX2 (10, 20 y 30 µg) se hibridaron con una dilución 1:1000 del suero anti-PadA y 0 µg, 50 µg, 100 µg y 200 µg de extracto proteico de *E. coli* “BL21 DE3 pLysS” respectivamente. No se observaron diferencias en el reconocimiento de la proteína PadA ni disminución en la intensidad de las bandas inespecíficas con ninguna de las concentraciones del extracto de bacteria empleadas.

3.5.3.2 *Purificación del suero con la proteína PadA recombinante pura de E. coli*

Una membrana de 12 cm² donde se había transferido 1 mg de la proteína His-PadA pura, se incubó con el suero anti-PadA. Durante 2 horas, se incubaron 5 mL del suero (diluído 1:1 en PBS) con la membrana y se desechó el suero libre. La fracción de Ig-s específicamente unida a la banda de His-PadA se liberó mediante una incubación de 5 min en pH ácido (100 mM Glicina-HCl pH 2) y su posterior neutralización con 1 M Tris HCl pH 8. Se probaron diferentes diluciones de este suero sustraído y la dilución 1:500, se utilizó de manera rutinaria, ya que revelaba menos bandas inespecíficas.

3.5.4 *Síntesis de un nuevo anticuerpo contra el carboxilo terminal de PadA*

Se diseñó un nuevo péptido para generar un nuevo anticuerpo contra PadA. El epítipo para el que se diseñó el péptido corresponde a los 25 últimos aminoácidos del carboxilo terminal, precisamente los 25 residuos que le faltan al mutante *padA*. El péptido con la secuencia aminoacídica PRSFEQFAKETFSNTSGSCTSKPVI fue sintetizado por un laboratorio de la red del ISCIII *Proteored* en el CNB (Madrid). El péptido se acopló a KLH (*keyhole limpet hemocyanin*: hemocianina extraída de molusco), un coadyuvante muy potente que aumenta la inmunogenicidad del antígeno. La inmunización del conejo para obtener el suero inmune se realizó de la misma manera que con el anterior (apartado 3.5.2). Desgraciadamente, el nuevo suero inmune (obtenido después de cuatro dosis de inmunización al conejo) seguía reconociendo muchas proteínas de manera específica, además de PadA. No supuso ninguna mejora respecto al anterior anticuerpo, de hecho el número de bandas reveladas por el nuevo suero en extractos proteicos de AX2 era incluso superior a las reconocidas por el anticuerpo contra la proteína completa.

3.5.5 Inmunodetección de proteínas en membrana (*Western blot*)

3.5.5.1 Preparación de extractos proteicos de células y estructuras del desarrollo

Los extractos de proteína total se prepararon a partir de células en crecimiento exponencial. Se lisaron 3×10^7 células en 500 μ L de tampón de ruptura (25 mM Hepes pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (v/v) Tritón X-100, y una mezcla de inhibidores de proteasas ("Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets"; 1 pastilla por cada 10 mL de tampón de ruptura) (Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania). Se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron durante otros 15 minutos a $13000 \times g$ para eliminar los restos de la lisis celular.

Cuando el material de partida eran estructuras del desarrollo (formadas por 6×10^7 células/placa) sobre agar ultrapuro en vez de células, se recogieron de la placa con la ayuda de una espátula y se lisaron en 1 mL del tampón de ruptura.

Para preparar extractos fraccionados, se sustituyó el Tritón X-100 por NP40 en el tampón de ruptura. Se procedió con el mismo protocolo de extractos totales y se separó la fracción soluble final (citoplásmica), del *pellet* (nuclear) a través de una centrifugación a $10000 \times g$ (en vez de $13000 \times g$).

3.5.5.1.1 Extracto proteico total de *E.coli* BL21 DE3 pLysS

Se preparó extracto proteico total de la bacteria donde se había expresado la proteína His-PadA. Se recogieron por centrifugación bacterias que habían crecido durante una noche en 50 mL de LB a 37°C. Se resuspendieron en 5 mL de un tampón de lisis (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4) mediante sonicación hasta que la muestra quedó transparente. El lisado se centrifugó a $12700 \times g$ durante 10 min a 4°C y el sobrenadante con las proteínas se conservó a 4°C.

3.5.5.2 Cuantificación de los extractos de proteína

Los extractos de proteína total se cuantificaron mediante el *kit* comercial "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad. California, EE.UU.) basado en el método de *Bradford*, en un lector de placas "Bio-Rad microplate reader 680" (Bio-Rad. California, EE.UU.) a 595 nm de longitud de onda.

3.5.5.3 Electroforesis y transferencia de las proteínas

El volumen de extracto requerido se mezcló (1:1) con el tampón de carga y se calentó a 95°C durante 10 min para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Las muestras se fraccionaron en geles SDS/PAGE del 10% o 12% (v/v) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Protran® (Whatman. Dassel, Alemania) mediante un sistema de transferencia semi-seca (Trans blot SD semi-dry transfer cell. Bio-Rad. California, EE.UU.). La transferencia se realizó durante 60 min 20 V y las membranas se tiñeron con solución de *Ponceau* (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente. Las membranas transferidas se bloquearon con un 5% (p/v) de leche desnatada en PBS-Tween®-20 (0,05% (v/v) (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Tras lavar el exceso de bloqueante con PBS-Tween, se incubaron con el anticuerpo primario en 0,1% de leche (p/v) en PBS-Tween 0,05% durante un mínimo de 15 horas a 4°C en agitación. Para el anticuerpo anti-PadA purificado se utilizó de manera rutinaria la dilución 1:500. Tras varios lavados con abundante PBS-Tween 0,05% en agitación, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente. En el caso de PadA se utilizó de rutina una dilución 1:5000 de Policlonal Goat Anti-rabbit immunoglobulins/HRP (Dako. Glostrup, Dinamarca) conjugado a peroxidasa y se reveló con el *kit* “ECL Western Blotting Substrate” (Pierce-Thermo. IL, EE.UU.), exponiéndolas a películas “AGFA Curix RP2 PLUS”.

Para detectar la proteína en extractos de células se cargaron de manera rutinaria 30 µg o 60 µg de proteína. Para las cepas que sobreexpresan la construcción A15::*padA* se utilizó 100 veces menos de proteína, 0,3 µg o 0,6 µg. Para la detección de la proteína en extractos proteicos de estructuras del desarrollo se cargaron 30 µg de proteína en todos los casos.

El anticuerpo contra GFP (Abcam) se utilizó a una dilución 1:2500 y el anti- α tubulina a 1:5000 (Monoclonal Anti α Tubulin, Clone DM1A. Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

3.5.6 Detección por *western blot* de proteínas presentes en el medio extracelular

Este método se utilizó concretamente para analizar los niveles de la proteína PdsA en el medio condicionado de las células *padA*- y AX2.

Las células se lavaron en QQ2 para someterlas a ayuno y se depositaron en placas de cultivo celular de 9 cm de diámetro a una densidad de 1×10^7 cells/mL en un volumen de 10 mL. A las 6,5 horas de desarrollo (momento en el que la expresión de *pdsA* alcanza su máximo) se

recogió todo el volumen del medio condicionado y se filtró a través de un poro de 0,45 μm (Sartorius. Goettingen, Alemania) y así eliminar las células que pudieran quedar flotando. Para precipitar las proteínas presentes en el medio se añadió ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) al 25% (v/v). Se incubó la mezcla durante 30 min en hielo y se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y 4°C (Centrífuga Sorvall, rotor SS34). Se desechó el sobrenadante y el *pellet* con las proteínas concentradas se lavó con acetona fría dos veces. Este *pellet*, una vez bien seco, se resuspendió en 400 μL de NaOH 0,1 M. El NaOH es muy necesario, ya que a pesar de los lavados con acetona, el ácido tricloroacético con el que se habían precipitado las proteínas acidificaba los extractos impidiendo una correcta electroforesis de las muestras. Se cuantificaron los extractos y se cargaron 20 μg , 40 μg y 60 μg de proteína total en un gel de poliacrilamida del 10%. Tras la electroforesis y transferencia, se realizó la hibridación de la membrana con una dilución 1:500 del anticuerpo policlonal anti-PdsA cedido por la Dra. C. Parent (García y Parent, 2008). El suero reconoce el epítipo LNDYYTPENWNYYSYG que abarca la secuencia aminoacídica desde el 64 hasta el 70. Se empleó TBS con 0,05% Tween, en vez de PBS con 0,05% Tween en todo el proceso, por recomendación de la Dra. C. Parent.

Por carecer de un anticuerpo para una proteína extracelular que se mantuviera constante durante el desarrollo, la corrección de la carga se realizó con la señal de la tinción *Ponceau* obtenida en las mismas membranas de nitrocelulosa recién transferidas. También se normalizó por la señal de la tinción *Coomassie* obtenida en un gel con la misma carga pero no transferido. Las películas se escanearon y las imágenes se analizaron con el programa “Quantity One® 4.3.6” (Bio-Rad. California, EE.UU.) para su cuantificación.

3.5.7 Detección de PadA por inmunocitoquímica

Se depositaron 6×10^4 células de AX2 y 1×10^5 células de *padA*⁻ sobre cubre-objetos estériles de 14 mm de diámetro en medio HL5 y se incubaron durante toda noche. Se retiró el medio y se fijaron con formaldehído al 0,37% en tampón fosfato PBM (20 mM KH_2PO_4 , 0,01 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 6,1) durante 30 min. Se lavaron con PBS pH 6,8 tres veces para retirar el fijador y se permeabilizaron con 0,1% Tritón®X-100 (Fluka, Alemania) en PBS durante 30 min. Se retiró el detergente y se lavaron abundantemente con PBS para incubarlas con el anticuerpo anti-PadA en PBS con 10% v/v suero de cabra normal (ImmunoPure Normal Goat Serum, Pierce. EE.UU.) para bloquear la detección inespecífica. La incubación se realizó en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Tras sucesivos lavados en PBS, los cristales se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Alexa Fluor 488

goat antirabbit. Molecular Probes. EE.UU.) (1:200) en PBS con suero de cabra. La incubación se mantuvo durante dos horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. Tras los pertinentes lavados, se incubaron durante 10 minutos con 0,1 µg/mL 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Invitrogen. EE.UU.) para la tinción de los nucleos. Tras múltiples lavados se montaron en porta objetos de 76 x 26 mm con Fluoromount-G™ (Southern-Biotech. EE.UU.) y se visualizaron en el microscopio confocal del servicio de microscopía confocal del CIB (CLSM Leica TCS SP2).

3.6 CARACTERIZACIÓN DE LA AFINIDAD POR COFACTOR DE PadA Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE PROTEÍNAS NMRA-LIKE EN *D. DISCOIDEUM*

* Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Cristina Vega, en concreto con la Dra. Vega y el Dr. Francisco Fernández.

3.6.1 Purificación de PadA para estudios de unión a cofactor

Se realizaron estudios de discriminación de la unión de cofactores (NAD⁺(H), NADP⁺(H) a PadA. Para obtener PadA de la pureza necesaria para este ensayo se clonó la secuencia codificante de PadA con los sitios NdeI y BglII en el plásmido de expresión pET3-a digerido NdeI/BamHI. Se transformó la cepa de *E.coli* "BL21 DE3" con el vector de expresión y se realizó una expresión y purificación de la proteína siguiendo métodos bioquímicos clásicos. En este caso se empleó un vector de expresión sin colas de afinidad (pET3-a) para evitar que éstas modificaran la conformación tridimensional de PadA y la afinidad por los cofactores. Se realizaron ensayos de DSF (*differential scan fluorimetry*) y ensayos de filtración en gel con PadA y los cofactores NAD⁺, NADPH, NADP⁺ y NADH.

3.6.2 Análisis filogenético de las proteínas *NmrA-like* en *D. discoideum*

Para el alineamiento de secuencias múltiple se emplearon los programas MAFFT v. 6.8 (Kato et al., 2005) y Gblocks v. 0.91b (Castresana, 2000). La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el programa FigTree v1. 3. 1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). El análisis filogenético de los homólogos de PadA se realizó con los programas de estimación de máxima verosimilitud RAxML v. 7.0.4 (Stamatakis, 2006) y de inferencia bayesiana MrBayes v3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). No se observaron diferencias topológicas entre los árboles generados con RAxML y con MrBayes.

3.7 ANÁLISIS POR MICROMATRICES DE ADNc DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE *padA* EN MEDIO HL5 Y MEDIO MÍNIMO

Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Eichinger, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Colonia, Alemania, durante los meses de Septiembre y Octubre de 2010.

3.7.1 Principio del análisis por micromatrices

La micromatriz para *D. discoideum* fue puesta a punto por el Dr. Eichinger y colaboradores y consta de secuencias de ADNc correspondientes a 5423 ESTs (*expression sequence tags*), obtenidos del proyecto de ADNc de *Dictyostelium* (www.csm.biol.tsukuba.ac.jp/DNAcproject.html), 450 secuencias parciales de genes publicados y 33 controles, lo que hace un total de 5906 genes diferentes por micromatriz. Todos los genes están representados por duplicado, excepto los controles que lo están en mayor número, lo que hace un total de 14620 puntos por cada matriz. Los controles positivos corresponden a ADN genómico de *D. discoideum* y a la mezcla comercial “SpotReport-10 Array validation kit” (Stratagene. California, EE.UU.) con 10 genes de *Arabidopsis thaliana* de concentración conocida. Los controles negativos corresponden al ADN de esperma de salmón, BstE II del fago λ , el gen Cot-1 humano y otros contenidos en una mezcla comercial. Los ADNc-s se habían fijado sobre los portaobjetos “Ultra Gaps coated slides” (Corning. NY, EE.UU.) previamente, tras una incubación de 2 horas a 80°C y se conservaban en un ambiente sin humedad ni aire.

3.7.2 Preparación de ARN para el análisis por micromatrices

Se aislaron 3 lotes de ARN de cada cepa y condición de crecimiento para posteriormente sintetizar ADNc. La extracción del ARN total se realizó según el protocolo habitual con algunas modificaciones. En vez de lisar todo el conjunto de células se realizó un fraccionamiento celular para poder obtener una porción enriquecida en citoplasma y libre de núcleos (para evitar en la mayor medida posible la contaminación con ADN genómico). Para ello se centrifugaron 3×10^7 células durante 5 min a $2700 \times g$ a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 175 μ l de tampón RLN frío, (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 140 mM NaCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,5% (v/v) NP-40) al que se le había añadido 500 U/mL de “RNase-out” (Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania) y 1 mM DTT (Invitrogen. Carlsbad, EE.UU.). La mezcla se resuspendió suavemente, sin agitar, para evitar romper el ADN genómico y se incubó en hielo durante 5 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min a $2700 \times g$ 4°C y se desechó el *pellet* por tratarse de la fracción enriquecida en núcleos. El sobrenadante, rico en ARN, se pasó a un tubo nuevo y se procedió con el protocolo de

aislamiento de ARN total con el *kit* “Illustra RNAspin mini GE”. El ARN total obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000. Thermo Scientific. New Hampshire, EE.UU.) y se precipitó con 0,1 vol. de AcNa pH 5,2 y 2,5 vol. de etanol 100% para conservarlo hasta la realización del experimento en el laboratorio del Dr. Eichinger.

El objetivo de este estudio era analizar los genes diferencialmente regulados en el mutante *padA*⁻ respecto a AX2 en dos condiciones de crecimiento diferentes; medio completo HL5, y medio mínimo (FM Minimal Medium).

En términos generales se siguió el protocolo publicado en Kaul y Eichinger (2006) pero con diversas modificaciones, por lo que se expondrá el protocolo completo. El ARN total correspondiente a las células en medio completo se resuspendió en agua libre de ARN-asas de manera que la concentración final fuera 1 µg/µl. De cada cepa se separaron 10 µg por duplicado (una para cada fluoróforo) para la síntesis de ADNc modificado (4 tubos en total). Se añadieron 10 µl de “Spikemix A” (SpotReport-10 Array validation kit. Stratagene. California, EE.UU.) al ARN de AX2 y 10 µl de “Spikemix B” (idéntica mezcla que “Spikemix A” pero con diferente concentración de los genes control) al de *padA*⁻. Las mezclas se precipitaron con 0,1 volúmenes de AcNa 3M pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se mantuvieron a -20°C un mínimo de 2 horas y, tras centrifugarlos y lavarlos con etanol 70% dos veces, el *pellet* se resuspendió en 12 µl de agua libre de ARN-asas.

3.7.3 Síntesis de ADNc modificado y marcaje con Cy3 y Cy5

El ARN se incubó con 1 µl de OligodT (500 ng/µl) (Stratagene-Agilent Tech. California, EE.UU.) a 70°C durante 10 min para inmediatamente ponerlo en hielo. Posteriormente se añadieron 5,7 µl de la siguiente mezcla: 1µl dNTP mix¹, 1,5 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl RNase block (40 U/µl), 0,7 µl de transcriptasa reversa “Stratascript” (50 U/µl) (Stratagene) y 2 µl del tampón comercial de la enzima.

Tras 25 min a 48°C, se volvieron a añadir 0,7 µl de “Stratascript RT” y, 35 min después, la reacción se paró con 10 µl NaOH 10 M, 10 min a 70°C y posterior neutralización con 10 µl HCl 1 M. Para eliminar restos de ARN se precipitó el ADNc con 4 µl AcNa 3 M pH 4,5, 1µl glicógeno y 100 µl etanol 95% frío. Tras 2 horas de precipitación a -20°C se procedió al marcaje con los fluoróforos.

¹ La mezcla de dNTP-s Contiene el nucleótido modificado aminoallyl dUTP al que, en la posterior reacción de marcaje, se unirán covalentemente los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Amersham).

Cada ADNc (procedente de la misma condición y cepa) se marcó con los dos fluoróforos (cianina Cy3 o Cy5 (Amersham-GE Healthcare. Buckinghamshire, UK)) por separado (Tabla 3) para minimizar los efectos de “dye bias” de los fluoróforos, es decir, las diferencias en el ratio de incorporación en el cDNA y en el rendimiento cuántico de cada uno de ellos (Rosenzweig *et al.*, 2004). Este procedimiento se realizó según el *kit* “Fairplay Microarray Labelling kit” (Agilent Technologies. California, EE.UU.) con algunas modificaciones. De las dos muestras de ADNc de cada cepa, una de ellas se marcó con Cy3 y la otra con Cy5 para que después se pudieran realizar las combinaciones pertinentes. El ADNc marcado se purificó con un sistema de columnas de afinidad, que incluye lavados con etanol 70%, para resuspenderlo en 50 µl Tris-HCl pH 8,5. Se comprobó la integridad, concentración y grado de acoplamiento de los fluoróforos con un espectrofotómetro y se mezclaron los ADNc control y experimento pertinentes, de tal modo que en un tubo, AX2 estaba marcado con Cy3 y *padA*⁻ con Cy5 (y al revés en el otro tubo). Las mezclas se precipitaron y resuspendieron en una solución de hibridación que contenía 1 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/mL), “Oligo dA” (18mer 100 µM) (Fairplay Microarray Labelling kit. Stratagene; Agilent technologies. California, EE.UU.) y 58 µl de tampón de hibridación (Tampón Na-fosfato, pH 6,8 0,12 M; EDTA 2 mM, formamida 50%; Na-laurilsarcosinato 1%, SDS 0,2% y 4X Solución de *Denhardt*). La mezcla se incubó 10 min a 80°C y se guardó en un lugar oscuro hasta el momento de la hibridación.

Tabla 3. Detalle de las hibridaciones realizadas.

Condición	Lote RNA	cDNA (ng/µl)		Acoplamiento del fluoróforo (dye/kb)		Nº de matriz	Control lote/fluor.	Experimento lote/fluor.
		AX2	<i>padA</i> ⁻	AX2	<i>padA</i> ⁻			
HL5	I	3,3 (Cy3)	2,9 (Cy5)	26,9 (Cy3)	39,8 (Cy5)	13972493	AX2 I Cy3	<i>padA</i> ⁻ I Cy5
	I	2,8 (Cy5)	2,5 (Cy3)	46,7 (Cy5)	24,7 (Cy3)	13972494	AX2 I Cy5	<i>padA</i> ⁻ I Cy3
	II	2,3 (Cy3)	3,6 (Cy5)	58 (Cy3)	33,7 (Cy5)	14196768	AX2 II Cy3	<i>padA</i> ⁻ II Cy5
	II	3 (Cy5)	3,6 (Cy3)	34,5 (Cy5)	36,7 (Cy3)	14196769	AX2 II Cy5	<i>padA</i> ⁻ II Cy3
	III	4 (Cy3)	4,1 (Cy5)	33,2 (Cy3)	37,3 (Cy5)	14196770	AX2 III Cy3	<i>padA</i> ⁻ III Cy5
	III	3,3 (Cy5)	3,4 (Cy3)	50 (Cy5)	30,6 (Cy3)	14196771	AX2 III Cy5	<i>padA</i> ⁻ III Cy3
MM	I	1,9 (Cy5)	3,8 (Cy3)	46 (Cy5)	31,8 (Cy3)	13972323	AX2 I Cy5	<i>padA</i> ⁻ I Cy3
	I	3,8 (Cy3)	2,2 (Cy5)	34,3 (Cy3)	55 (Cy5)	13972331	AX2 I Cy3	<i>padA</i> ⁻ I Cy5
	II	2,2 (Cy3)	2,7 (Cy5)	26,3 (Cy3)	36,9 (Cy5)	14196773	AX2 II Cy3	<i>padA</i> ⁻ II Cy5
	II	3,8 (Cy5)	2,7 (Cy3)	44,3 (Cy5)	39,7 (Cy3)	14196776	AX2 II Cy5	<i>padA</i> ⁻ II Cy3

Condición	Lote RNA	cDNA (ng/μl)		Acoplamiento del fluoróforo (dye/kb)		Nº de matriz	Control lote/fluor.	Experimento lote/fluor.
	III	4,9 (Cy3)	4,5 (Cy5)	39,3 (Cy3)	51 (Cy5)	14196778	AX2 III Cy3	<i>padA</i> ⁺ III Cy5
	III	2,5 (Cy5)	3 (Cy3)	30,2 (Cy5)	43,3 (Cy3)	14196779	AX2 III Cy5	<i>padA</i> ⁺ III Cy3

Tabla 3. Detalle de las hibridaciones realizadas en el análisis por micromatrices. Se detalla el lote de ARNm utilizado, el fluoróforo con el que se marcó el ADNc, el grado del acoplamiento del fluoróforo, el nº del código de barras de los portaobjetos-micromatriz y las combinaciones de fluoróforos empleadas con cada lote y condición.

3.7.4 Pre-hibridación e hibridación de los portaobjetos

Cada portaobjeto-micromatriz estaba marcado con un código de barras para su identificación. Los portaobjetos asignados se pre-hibridaron en una solución (20,7 mL agua desionizada; 22,5 mL SSC 20X; 45 mL formamida; 900 μl SDS 10%; 900 μl BSA 10 mg/mL) previamente calentada a 42°C. Tras una incubación de 45 min, se lavaron con agua destilada y se sumergieron en isopropanol puro para centrifugarlos inmediatamente y tenerlos preparados para la hibridación.

La hibridación se llevó a cabo en la estación de hibridación “Slide Booster” (Advalytix-Beckman Coulter. Krefeld, Alemania) donde, siguiendo las instrucciones del fabricante, se colocó el portaobjetos cubierto por la solución de hibridación y un cubreobjetos. En este paso es esencial asegurarse de que no queden burbujas de aire entre el portaobjetos y el cubreobjetos. La hibridación se llevó a cabo durante 4 horas a 42°C y alta humedad para evitar que la sonda se reseca.

Tras la hibridación se lavaron los portaobjetos durante 5 min en agitación con SDS 0,1% en SSC 2X, 5 lavados de 15 s con SDS 0,1% en SSC 0,1X y otra tanda igual con SSC 0,1X y finalmente 15 s con SSC 0,01X. Se centrifugaron rápidamente a 235 x *g* durante 5 min y se guardaron en una cámara oscura hasta su escaneo.

3.7.5 Análisis de los datos

El análisis de la señal de los fluoróforos se recogió en el escáner confocal “ScanArray 4000 XL confocal laser scanner” (Perkin Elmer Life Sciences. Waltham, EE.UU.). Los portaobjetos se escanearon con el laser 1 (633 nm) y laser 3 (553 nm) correspondientes a las longitudes de onda de los fluoróforos Cy3 y Cy5. Se realizaron los ajustes correspondientes en la potencia de los láseres y del fotomultiplicador para optimizar la señal con el programa

“ScanArray Express 3.0” (Perkin Elmer Life Sciences. Waltham, EE.UU.) para la posterior cuantificación. Debido a que en algunos puntos la señal estaba saturada hubo que realizar dos escaneos con cada portaobjetos, uno “medio” para recoger la señal de la mayoría de los puntos y otra “débil” para captar la señal de los puntos más saturados. La intensidad de la señal recogida por el escáner fue cuantificada por este programa, pero antes de analizar estadísticamente estos datos fue necesario hacer una comprobación, a mano, de cada uno de los puntos de las matrices. Esto se debe a que el programa, en algunos casos, seleccionaba como señales específicas puntos que eran “ruido” o suciedad (Fig. 14). Posteriormente los archivos .CSV se convirtieron a archivos .txt para poder procesarlos con el programa “BRB Arraytools 3.0” (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Este programa es un complemento de Microsoft Excel® para poder importar y exportar datos de micromatrices. Los datos obtenidos se exportaron al programa estadístico “R” 1. 6. 2 (r-project.com) para su normalización y otra vez al “Arraytools” para poder manejarlos. Los datos se procesaron con el programa “SAM” (Significance Analysis for Microarray) para la identificación de genes diferencialmente expresados (Tusher *et al.*, 2001).

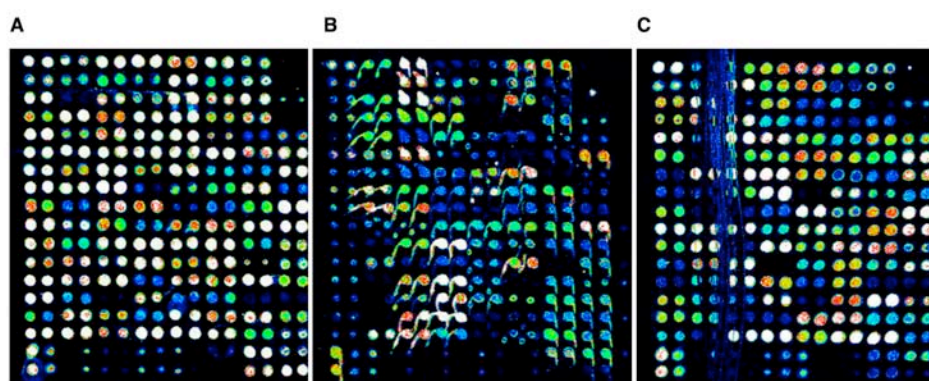


Figura 14. Comprobación manual de la señal de hibridación de las micromatrices. Se muestran 3 ejemplos de puntos a descartar en el análisis. **A)** Los puntos blancos están saturados. **B)** Puntos mal impresos en el portaobjetos. **C)** Puntos a descartar por mala manipulación en el proceso de hibridación.

El listado de genes diferencialmente regulados se clasificó según criterios del *Gene Ontology* (www.geneontology.org). El GO es un proyecto cuyo objetivo es crear un sistema de anotación génica aplicable a todos los organismos y se clasifica en tres categorías que describen el **proceso biológico** (“biological process”), la **función molecular** (“molecular function”) y **componente subcelular** (“cellular component”) para cada gen (Ashburner *et al.*, 2000; Gene ontology consortium, 2004). Se empleó el programa de clasificación GO adaptado a *D.*

discoideum, GOAT 2.0 (Gene Ontology Analysis Tool-
<http://dictygenome.bcm.tmc.edu/Downloads/GOAT/>).

GOAT calcula el enriquecimiento y la significancia estadística para cada término GOAT (comparando el número de genes de nuestra lista observado en una categoría con el número de genes que aparecerían en la misma categoría si la selección fuera al azar) y ofrece una representación gráfica de los grupos significativamente enriquecidos. Dentro de cada categoría GO, se engloban subgrupos que representan a estas categorías y que vienen acompañados de un número indicador del grado de especificidad de ese proceso/función/componente. A mayor especificidad, menor el valor numérico (Ashburner *et al.*, 2000). Es importante destacar que un mismo gen puede estar englobado en más de una subcategoría dentro de las categorías principales del GO.

Adicionalmente, los genes regulados se clasificaron según un criterio independiente del GO, el *Yeast Ontology* adaptado para *D. discoideum* (Urushihara *et al.*, 2004).

3.8 TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE *D. DISCOIDEUM*

3.8.1 Crecimiento

3.8.1.1 Crecimiento en medio sólido sobre césped de *K. Aerogenes*

Las amebas de *D. discoideum* se depositaban sobre un césped de bacterias de la especie *Klebsiella aerogenes* que previamente habían crecido en un medio líquido rico: SM (10 g/L bacto peptona, 1 g/L extracto de levadura, 10 g/L glucosa; 1 g/L MgSO₄, 1,9 g/L KH₂PO₄, 0,6 g/L K₂HPO₄; pH 6,3). Las bacterias crecían a 22°C durante 48 horas y después se conservaban a 4°C durante 2 semanas. 300 µl de bacterias se depositaban sobre placas de SM + 20 g/L agar bacteriológico americano (Laboratorios Conda, Madrid) y sobre este césped se depositaban los cristales con las esporas embebidas o las amebas congeladas en suero.

3.8.1.2 Crecimiento en medio axénico

3.8.1.2.1 Medios de cultivo

El medio de cultivo axénico utilizado para el crecimiento de las amebas fue el medio comercial HL5 (Formedium, Norfolk, UK). El medio liofilizado se disolvió en agua ultrapura MilliQ (Millipore, Billerica, EE.UU.) a una concentración de 23,26 g/L y se ajustó el pH a 6,3 con ácido fosfórico (Merck, Darmstadt, Alemania). Tras autoclavar la mezcla se completó con una solución de glucosa concentrada 1,24 M (224 g/L) previamente preparada (Merck, Darmstadt,

Alemania) y estéril hasta una concentración final de 14 g/L; 200 µg/mL estreptomicina y 10 µg/mL tetraciclina (ambos de Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.). Los cultivos de células se mantuvieron a 22°C en agitación constante a 180 rpm en un agitador orbital Minitron (Infors, Suiza).

En la primera parte del trabajo, centrada en la caracterización del crecimiento, se utilizaron, además de HL5, otros medios mínimos comerciales: “FM Minimal Medium” y “FM Minimal Medium without NH₄Cl” (Formedium. Norfolk, UK). Son medios mínimos definidos, porque sólo contienen aminoácidos esenciales, vitaminas, microelementos, minerales y glucosa como única fuente de carbono. En contraposición al medio HL5, mucho más rico, que contiene extracto de levadura, peptona y fosfatos (Na₂HPO₄ y KH₂PO₄).

3.8.1.2.2 *Contaje de células en crecimiento en medio axénico*

El contaje de las células en medio axénico se realizó con una cámara “Fuchs-Rosenthal” (Marienfeld. Alemania) con las diluciones pertinentes. Las amebas se observaron en un microscopio de campo claro “Nikon Eclipse TS100”.

3.8.2 *Transfección de Dictyostelium por electroporación*

Se realizó según el método descrito en Pang y colaboradores (1998). Se tomaron 5 x 10⁶ células en crecimiento exponencial y se centrifugaron a 12700 x g durante 12 s. Se lavaron dos veces en tampón de electroporación H50 frío (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 5 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄ pH 7.0) y se resuspendieron en 100 µL de H50 a los que se añadió 10 µg de la construcción plasmídica correspondiente. Se incubaron en hielo 5 min y se transfirieron a una cubeta de electroporación con un electrodo de 0,1 cm “Gene Pulser Cuvette” (Bio-Rad. California, EE.UU.). Se electroporaron (Gene Pulser. Bio-Rad. California, EE.UU.) a 0,75 V y 25 µF con dos pulsos cada cubeta y un intervalo de 12 s. Inmediatamente se añadieron 500 µL de medio HL5 a la cubeta y se incubó en hielo 5 min para posteriormente depositar las células tranfectadas en una placa de cultivo con 10 mL de medio HL5. A las 24 horas se seleccionaron con el antibiótico correspondiente.

padA⁻ presenta una exacerbada sensibilidad a la gentamicina (G-418), el antibiótico cuyo vector de resistencia portan los vectores de expresión empleados. Por este motivo las construcciones en fondo *padA*⁻ se seleccionaron únicamente con 5 µg/mL de G-418, frente a los 20 µg/mL del silvestre.

3.8.3 Desarrollo de *D. discoideum*

3.8.3.1 Desarrollo sobre filtro de nitrocelulosa

Se recogieron células en crecimiento exponencial ($3-6 \times 10^6$ células/mL) y se lavaron dos veces en tampón fosfato "QQ2" (16,5 mM KH_2PO_4 ; 3,9 mM K_2HPO_4 , pH 6,3) para garantizar la ausencia total de nutrientes. Las células se centrifugaron a $200 \times g$ durante 3 min y se resuspendieron en QQ2 suplementado con 2 mM MgSO_4 . Las células se depositaron sobre filtros de nitrocelulosa (0,45 μm , BlackHABP, 47 mm Millipore. Billerica, EE.UU.) previamente humedecidos en agua desionizada a una densidad de $2,51 \times 10^6$ células/cm². Estos filtros se habían colocado previamente sobre soportes de celulosa absorbente (absorbent pads, Millipore. Billerica, EE.UU.) embebidos en QQ2+2 mM MgSO_4 . Se incubaron a 22°C en cámaras húmedas durante el tiempo necesario para cada experimento.

3.8.3.2 Desarrollo sobre agar purificado

Los desarrollos sobre agar permiten una visualización muy clara del proceso de agregación. Se utilizó agar purificado (Oxoid. Cambridge, UK) al 1,8% disuelto en QQ2 (25 mL) que se vertió sobre placas de petri de 9 cm de diámetro (para la extracción de proteína a lo largo de 24 horas) o (10 mL) sobre placas de 3 cm de diámetro para el estudio fenotípico. Se depositaron células lavadas y resuspendidas en QQ2+ 2 mM MgSO_4 a una densidad de $9,5 \times 10^5$ células/cm² para la extracción proteica, y a $2,5 \times 10^5$ células/cm² (y sin MgSO_4) para el estudio de la agregación. Se incubaron a 22°C en cámaras húmedas el tiempo necesario para cada experimento.

3.8.3.3 Desarrollo sobre filtros de teflón para hibridación *in situ*

La realización de hibridaciones *in situ* sobre estructuras de desarrollo requiere el uso de filtros resistentes a solventes orgánicos. Estos filtros de teflón® (Omnipore TM, Millipore. Billerica, EE.UU.) se colocaron sobre un papel de cromatografía (3MM Chr Whatman. GE Buckinghamshire, UK) humedecido en QQ2+2 mM MgSO_4 . Se depositaron las células lavadas en QQ2+2 mM MgSO_4 sobre los filtros a una densidad de $2,04 \times 10^6$ células/cm². Después, estos filtros se depositaron sobre una cama de 25 mL de agar purificado al 1,8% disuelto en QQ2+2 mM MgSO_4 en placas de petri de 9 cm de diámetro. Se incubaron en cámaras húmedas a 22°C.

3.8.3.4 Desarrollo (agregación) en condiciones sumergidas

El desarrollo en condiciones sumergidas es una herramienta muy útil para visualizar defectos en el proceso agregativo. Al estar sumergidas, las células no avanzan más allá de la agregación y forman, tras 12-14 horas, una masa de células, redondeada pero irregular, que sólo consigue avanzar en el desarrollo en una interfase aire-agua o agua-aceite mineral (Bonner, 1947) (Fig. 15). Además, las condiciones particulares de esta técnica permiten la manifestación de fenotipos sutiles en la agregación, que se magnifican por la disminución del coeficiente de difusión de las moléculas en el agua respecto al aire.

Las células en ayuno se depositaron en placas de 6 pocillos (35 mm. Falcon-BD. EE.UU.) a una densidad de $1,56 \times 10^5$ células/cm² en 1,5 mL de QQ2. Se incubaron en una cámara húmeda entre 10 y 12 horas y se visualizó el proceso de agregación.

En todos los casos, las fotografías se tomaron con una cámara Leica DFC420 acoplada a una lupa Leica MZ95 (Leica. Solms, Alemania) a diferentes aumentos. Las fotografías del proceso de agregación de las cepas que expresaban GFP o RFP se tomaron en la cámara Leica DFC420 acoplada a una lupa de fluorescencia MZ 16FA (Leica. Solms, Alemania) con el filtro y magnificación adecuada.

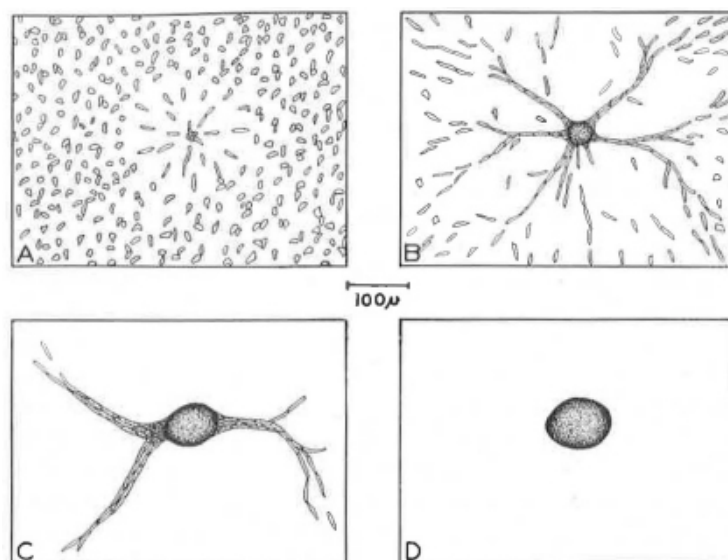


Figura 15. Ilustración del proceso de agregación sumergida (Bonner, 1947).

3.8.4 Otras técnicas específicas

3.8.4.1 Cuantificación del AMPc

3.8.4.1.1 Cuantificación del AMPc extracelular

Células en crecimiento exponencial se sometieron a ayuno en QQ2 y se concentraron hasta 5×10^6 cells/ μ l (1×10^8 células en 200 μ l de QQ2). Se sometieron a agitación (22°C, 180 rpm) durante 7 h. Se eliminaron las células por centrifugación, 15 s a $12700 \times g$ y otros 5 min más para congelar inmediatamente el sobrenadante a -80°C. El caldo condicionado de estas células se obtuvo sin añadir DTT (inhibidor de la fosfodiesterasa extracelular), con lo cual los datos obtenidos en la cuantificación serían el resultado de la producción y degradación intrínseco de las células. Los medios condicionados de los diferentes experimentos se sometieron a cuantificación por un inmuno-ensayo enzimático comercial, “Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA)” (RPN 225 GE. Buckinghamshire, UK). Este *kit* se basa en la unión competitiva del AMPc acoplado a peroxidasa y el AMPc de las muestras problema por el anticuerpo antiAMPc del *kit*. Se empleó el protocolo para cantidades de AMPc por encima de 2-128 fmol/pocillo y se siguieron las indicaciones del fabricante.

3.8.4.1.2 Cuantificación del AMPc total a las 6 h de desarrollo

El objetivo de este protocolo era cuantificar la amplitud del pulso de AMPc, es decir, la producción de AMPc total generado por la estimulación de las células con AMPc. Para ello se diseñó un experimento basado en el protocolo de Van Haastert (2006) donde células estimuladas con un análogo del AMPc, el 2'-deoxy-cAMP (que une el receptor de AMPc pero no une la PKA) (Pitt *et al.*, 1993; Van Haastert, 1983), se lisan tras 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 min de estimulación. Se prepararon células competentes para la agregación durante 6 h en ayuno y agitación a alta densidad (1×10^7 células/mL). Previo al ensayo, se concentraron a 5×10^7 células/mL durante 10 min adicionales y se estimularon con 20 μ L de solución de estimulación (50 μ M 2'-deoxy-cAMP; 50 mM DTT) (excepto en el de 0 min donde se añadirán 100 μ L de PCA (ácido perclórico) 3,5% (v/v) desde el principio). Se añadieron 80 μ L de la solución de células a cada tubo (4×10^6 cells) y en los tiempos de estimulación indicados se paró la reacción con 100 μ L de PCA 3,5% (v/v). Tras agitar los tubos se guardaron a -20°C inmediatamente hasta su cuantificación. Se añadieron 50 μ L de KHC₃ (saturado al 50% a 22°C) para neutralizar la reacción y, tras agitar y centrifugar 2 min a $14000 \times g$, se conservó el sobrenadante para cuantificar el AMPc total con el mismo *kit* del apartado anterior. Desgraciadamente, no se pudo completar el ensayo, ya que este *kit* se basa en reconocimiento anticuerpo-antígeno, y el anticuerpo anti-AMPc provisto en el *kit* no discriminó entre el AMPc producido y el análogo

utilizado para inducir la actividad enzimática. A día de hoy no se comercializa el *kit* radiactivo de Amersham TRK432 que se basaba en la unión específica del AMPc a la PKA, discriminando totalmente el análogo 2'-deoxy-cAMP que no une PKA. Sin embargo, este protocolo sí nos permitió cuantificar el AMPc presente en el control de 0 min, que en realidad son células en ayuno durante 6 horas, a muy alta concentración y con la PdsA inhibida gracias al DTT.

3.8.4.2 Ensayo de quimiotaxis sobre agar purificado

Para analizar la respuesta quimiotáctica de las amebas hacia un gradiente de AMPc nos basamos en el protocolo descrito por la Dra. M. Nelson en *dictybase* (http://dictybase.org/teaching_tools/index.html) con algunas modificaciones. Se trata de un ensayo semicuantitativo, pero permite valorar el rango de AMPc que el mutante es capaz de detectar.

Un día antes del ensayo, células en crecimiento exponencial ($2-7 \times 10^6$ células/mL) se lavaron en QQ2 dos veces (centrifugaciones de 3 min a $200 \times g$) y se concentraron hasta 2×10^7 células/mL. Se incubaron a 15°C en agitación (180 rpm en agitador orbital *Celloshaker*. Renner GMBH, Alemania) durante 15-16 horas y a 22°C durante tres horas adicionales. Para el ensayo se centrifugaron y se concentraron hasta $2,5 \times 10^8$ células/mL. Mientras, se prepararon soluciones de AMPc (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) con las concentraciones a testar (0, 1, 2,5, 5, 10, 100, y $200 \mu\text{M}$) en agua milliQ (Millipore. Billerica, EE.UU.). Se depositó una gota de $1,5 \mu\text{l}$ de cada dilución sobre una placa (84 mm) de agar purificado (1,8%). Previamente se habían marcado los puntos exactos con las distancias donde debían depositarse las gotas de AMPc tal como se observa en el esquema de la Figura 16. A una distancia de 3,5 o 7 mm de cada concentración de AMPc se depositó una gota de $1,5 \mu\text{l}$ ($3,75 \times 10^5$ células) de la solución celular concentrada (Fig. 16). Tras una incubación en cámara húmeda de 2 horas a 22°C , se observaron las placas y se fotografió el perfil quimiotáctico de cada cepa para cada concentración de AMPc. Se tomaron fotografías a las 3, 15, y 24 horas con una cámara acoplada a la lupa.

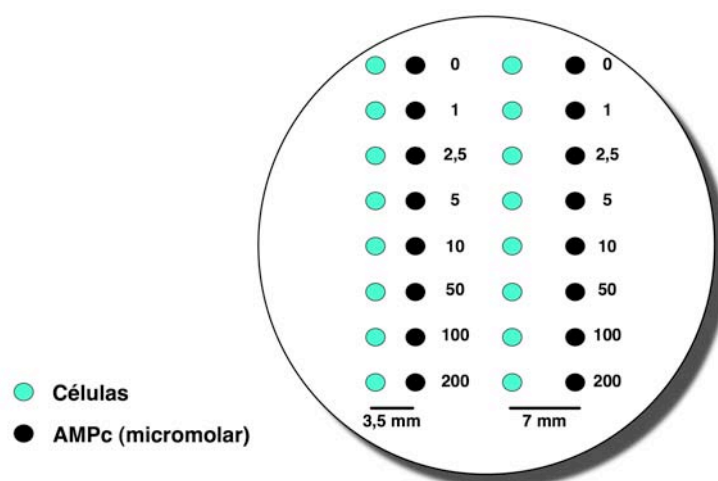


Figura 16. Esquema del ensayo de quimiotaxis. Se representa una placa de *Petri* con agar ultrapuro. Los puntos verdes son las células competentes para la agregación. Los puntos negros, las diferentes concentraciones de AMPc (μM).

3.8.4.3 Ensayo de la actividad fosfodiesterasa

Este ensayo está basado en la idea original de Bonner y colaboradores (Shimomura *et al.*, 1982) con algunas modificaciones.

Células en crecimiento exponencial alto ($5-7 \times 10^6$ células/mL) se lavaron dos veces en QQ2 para inducir el ayuno y se concentraron hasta 2×10^7 células/mL. Se mantuvieron en agitación a 180 rpm y 22°C durante 6 horas y posteriormente se centrifugaron hasta obtener una solución celular muy concentrada ($3,2 \times 10^5$ células/ μL). Se depositó una gota de $1,5 \mu\text{L}$ ($4,8 \times 10^5$ células) sobre una superficie de agar purificado al 1,8 % en el centro de un pocillo de 35 mm. Este agar contenía 0 nM (control), 100 nM o 300 nM de AMPc, de manera que las células degradan el AMPc del medio mediante la fosfodiesterasa extracelular y generan un gradiente de AMPc. Tras 2,5 horas de incubación a 22°C en cámara húmeda, fue posible visualizar cadenas y grupos de células que habían migrado desde la periferia de la gota hacia fuera. Consideramos la distancia de migración de las células una medida semi-cuantitativa de la actividad fosfodiesterasa extracelular de las mismas. Se obtuvieron fotografías con la cámara Leica DFC420 acoplada a una lupa Leica MZ95 (Leica. Solms, Alemania) a diferentes aumentos y tiempos.

3.8.4.4 Detección de la actividad β -galactosidasa en estructuras de desarrollo

Esta técnica se utilizó para detectar la actividad promotora de genes fusionados al gen de la β -galactosidasa. Existen dos variantes de este gen reportero, la estable y la lábil (Detterbeck *et al.*, 1994). La forma menos estable es muy útil para analizar actividades de promotores, ya que la variante estable de la β -galactosidasa sigue activa tiempo después de que el ARNm del gen de interés haya desaparecido. Sin embargo, la lábil permite seguir la actividad de un promotor *in vivo*, con un desfase máximo de 1 h en su expresión (Detterbeck *et al.*, 1994). Las amebas portadoras del vector de expresión correspondiente se sometieron a ayuno y se depositaron sobre filtros de nitrocelulosa. Al alcanzar el estadio del desarrollo deseado, las estructuras se soltaron del filtro con una solución fijadora de glutaraldehído 0,1 % (Fluka, Suiza) disuelto en PBS 1 mM MgCl_2 . Se depositaron en una placa de 35 mm de diámetro durante 5 min y posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1 mM MgCl_2 para eliminar el exceso de fijador. Se añadió 5 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-gal; sustrato de la β -galactosidasa) disuelto en una mezcla de cianuros $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 500 mM (Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.) y $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Merck. Darmstadt, Alemania) 500 mM (1:1). Se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad, hasta que tuvo lugar la reacción. Se lavaron con PBS 1 mM MgCl_2 para parar la reacción. En algunos casos, las estructuras se tiñeron posteriormente con eosina para facilitar la visualización de las estructuras, sobre todo en las que había poca señal.

Las estructuras teñidas se visualizaron en una lupa Leica MZ95 y las fotografías se tomaron con la cámara (Leica DFC420) acoplada a la lupa.

3.8.4.5 Hibridación *in situ* sobre estructuras del desarrollo

La técnica de hibridación *in situ* para las diferentes sondas analizadas se llevó a cabo según el protocolo de Escalante y Sastre (2006) con algunas modificaciones.

Las ribosondas se transcribieron y marcaron con digoxigenina con el *kit* comercial DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los plásmidos con el ADNc (o fragmento de ADNc) de interés para la síntesis de las sondas fueron cedidos, en algunos casos, por otros laboratorios. En el caso de *acaA*, el plásmido con la ORF completa del gen fue donado por la Dra. P. Schaap; y el vector con la EST SLC339 de *pdsA* fue facilitado por H. Urushihara (Morio *et al.*, 1998). A partir de este ADNc se sintetizaron sondas sentido y antisentido para cada uno de los genes, y en el caso de *acaA*, *padA* y *pdsA*, se trataron con una solución con carbonato 15 min a 65°C (120 mM NaCO_3 , 80 mM NaHCO_3 pH 10,2) para facilitar la hibridación, dado el gran tamaño de estas sondas. Se visualizó una

pequeña cantidad de las sondas en gel de agarosa al 1,2%, realizando la electroforesis a voltaje constante (90 V) durante 65 min. Se cuantificaron en el “NanoDrop” y se guardaron hasta el momento de la hibridación.

Las estructuras de desarrollo deseadas se fijaron sobre filtros de teflón® (ver apartado 3.7.3.3). Inicialmente se deshidrataron con metanol 100 % (5 min), etanol 100 % (5 min) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 3 horas. Se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 0,05%-Tween en agitación y se deshidrataron progresivamente con etanol 30% (en agua libre de ARN-asas), etanol 50% y etanol 70% (5 min con cada uno) para después congelar las estructuras en etanol 70% a -20°C. Estas estructuras podían permanecer fijadas y congeladas durante meses hasta la hibridación con la sonda de interés. Las estructuras se rehidrataron en etanol 50% y etanol 30% durante 5 min y tras 4 lavados con PBS-Tween 0,05% se permeabilizaron incubándolas con una solución de proteinasa K (Sigma-Aldrich. St Louis, EE.UU.) 20 µg/mL durante 15 min a temperatura ambiente y agitación. Se repitieron los lavados con PBS-Tween y se volvieron a tratar con paraformaldehído al 4%, durante 20 min a temperatura ambiente y agitación, para facilitar que se fijase la proteinasa K. Tras tres lavados, las estructuras quedaron listas para la hibridación con las sondas. Se incubaron los filtros en tampón de hibridación (60% formamida, 40% SSC 10X (tampón citrato salino de sodio) 0,5 mg/mL de esperma salmón) durante 3 horas a 42°C y agitación. Se desnaturalizaron las sondas sentido y antisentido a 95°C durante 5 min y se añadieron al tampón de hibridación, en el que, se incubaron las estructuras durante toda la noche. Se realizaron lavados de 30 min, con concentraciones seriadas descendentes de SSC (2X, 1X, 0,1X) y se equilibraron 5 min con tampón maleico 0,1 M (100 mM ácido maleico, 100 mM NaCl pH 7,5). Se incubaron las estructuras con Blocking Reagent al 1% (Roche diagnostics. Mannheim, Alemania) en tampón maleico durante 30 min y, sobre el mismo tampón se añadió el anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:1000)(Anti-Dig. Roche diagnostics. Mannheim, Alemania) que se mantuvo durante toda la noche a 4°C. Tras lavados con tampón maleico, se equilibraron las estructuras con tampón de detección (50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 100 mM Tris HCl pH 9,5) y, en este mismo tampón, se añadió el sustrato de la fosfatasa alcalina (20 µl/ml de la mix NBT/BICP (Roche diagnostics. Mannheim, Alemania)) que nos permitirá visualizar la señal de la hibridación tras incubar las estructuras en oscuridad. Se tomaron fotografías de las estructuras hibridadas en la lupa Leica MZ95 con una cámara (Leica DFC420) acoplada a la misma.

3.8.4.6 Ensayos de adhesión

3.8.4.6.1 Adhesión célula-célula durante el desarrollo temprano (0-8 horas)

Para realizar un análisis general de la adhesión célula-célula en el inicio del desarrollo se utilizó un protocolo basado en un artículo de Roissin-Bouffay (Roissin-Bouffay *et al.*, 2000) con pequeñas modificaciones. Se depositaron 5×10^6 células en ayuno sobre un filtro de nitrocelulosa ($2,51 \times 10^6$ cells/cm²). Se dispusieron 5 filtros con células, uno para cada tiempo del desarrollo y a las 0, 0,5, 2,5, 4, 6 y 8 horas del desarrollo, las estructuras se soltaron con QQ2 y se disgregaron mecánicamente agitándolas durante 20 s a máxima potencia. 500 µL de las células individuales se pasaron a un tubo *ependorff* de 2 mL que se agitó a 180 rpm durante 20 min. El número de células que se mantenían de forma individual (sin agregar) se cuantificó en una cámara “Fuchs-Rosenthal”, tomando como referencia el número de células totales nada más disgregarlas (un control para cada tiempo del desarrollo). Las células del tiempo 0 h del desarrollo se sometieron directamente a agitación tras disgregarlas, sin depositarlas sobre filtro. Es importante que las células de AX2 y *padA*⁻ estuvieran en una densidad celular similar antes de inducir el ayuno. El periodo del desarrollo en el que se realiza este experimento abarca el tiempo de expresión de las tres proteínas implicadas en adhesión célula a célula durante el desarrollo temprano, *cadA*, *csA* y *lagC*.

3.8.4.6.2 Adhesión célula-célula dependiente de EDTA

El análisis de adhesión célula a célula dependiente de EDTA se realizó según Wong y colaboradores (2002) con pequeñas modificaciones. Células en crecimiento exponencial se lavaron y se resuspendieron en QQ2 en alta densidad (2×10^7 células/mL) para inducir el desarrollo. Se mantuvieron en agitación (22 °C, 180 rpm en agitador orbital *Minitron*, de *Infors*) durante 3 horas (antes de que comenzara la expresión de *csA*, resistente a EDTA) y, posteriormente, se diluyeron hasta una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/mL. Se tomaron dos alícuotas de 200 µl de cada cepa y se disgregaron mecánicamente con un *vortex* durante 15 segundos. Se cuantificó el número de células con una cámara de conteo y este número se consideró el tiempo 0, el control. Se añadieron 4 µl de EDTA 0,5 M a uno de los dos tubos de células de cada cepa para obtener EDTA 10 mM final. Las células se sometieron a agitación (180 rpm RT en agitador orbital *Minitron*, de *Infors*) y a los 20, 40 y 60 min se tomaron alícuotas para contar el número de células no agregadas (los dobletes fueron considerados como células agregadas). Al realizar el conteo resulta esencial no realizar ninguna dilución, dado que, al mezclarlas, podemos disgregar los agregados y alterar el resultado del ensayo.

3.8.4.6.3 Adhesión célula-célula durante el desarrollo tardío

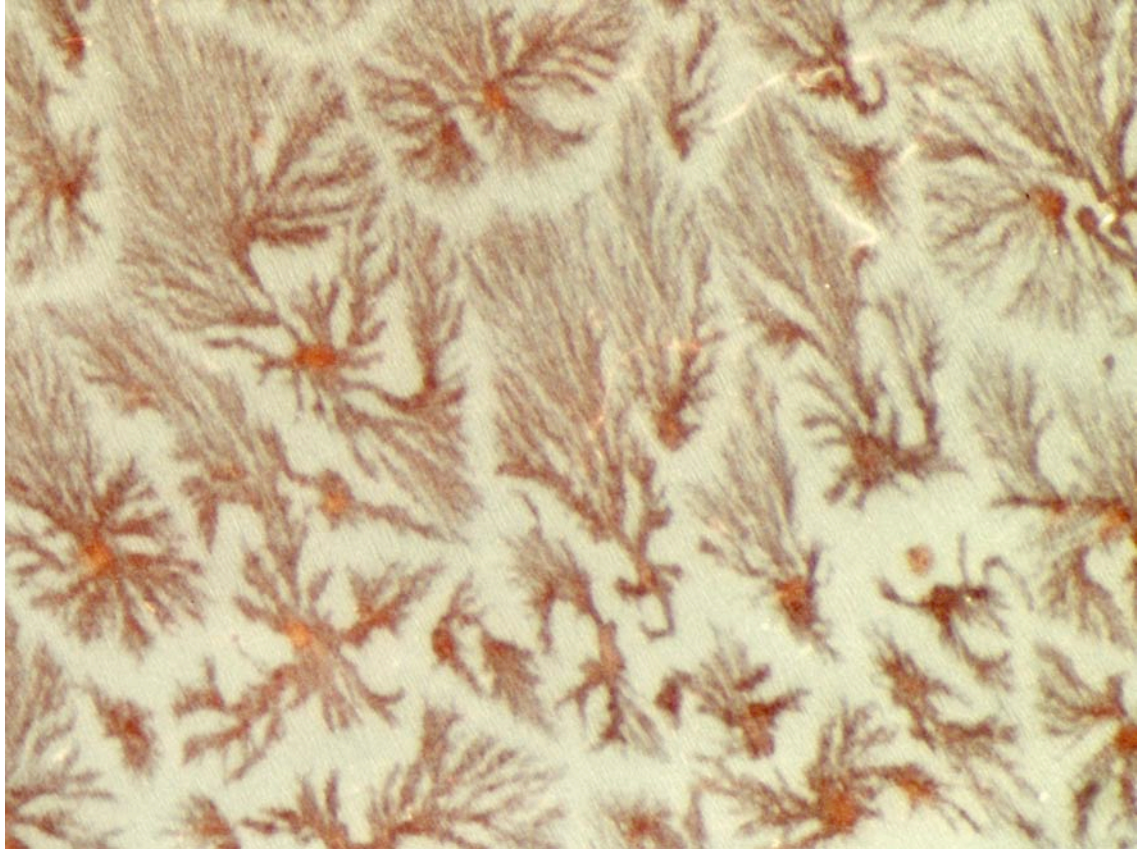
Para analizar la adhesión célula-célula en estadios posteriores del desarrollo se siguió un protocolo basado en Wong y colaboradores (2002) con modificaciones. Se depositaron células en ayuno sobre filtros enteros de nitrocelulosa ($2,51 \times 10^6$ cells/cm²) y se incubaron a 22 °C hasta las 14-16 horas, cuando las estructuras alcanzaron el estadio de *tipped-mound/first finger*. Con una pipeta y 1 mL QQ2 las estructuras se soltaron en un tubo *eppendorf* de 2mL, donde se disgregaron mecánicamente con una jeringa y una aguja de 21G. El número de succiones necesario para disgregarlas será mayor cuanto más avanzado esté el desarrollo, debido a la consistencia de la cubierta glicoproteica que las cubre. Se cuantificó el número de células totales de ambas cepas después de disgregarlas y se incubaron en agitación (120 rpm en agitador orbital *Celloshaker* de *Renner GMBH*) a 5×10^5 células/mL durante 20, 40 y 60 minutos. En cada tiempo se cuantificó el número de células individuales, que no se habían reasociado. En este experimento es crítico el proceso de disgregación con jeringa, ya que si la fuerza en la succión es demasiado grande las células pueden dañarse.

3.8.4.6.4 Adhesión al sustrato durante el desarrollo temprano

Células en ayuno y baja concentración ($1,5-2 \times 10^5$ cells/cm²) se depositaron sobre placas de 6 pocillos de plástico (35 mm. Falcon-BD. EE.UU.). Tras 1 hora de incubación a 22°C y sin agitación para permitir que las células se adhieran al fondo, se retiró el sobrenadante para eliminar las células que no se habían adherido. Tras añadir QQ2 fresco, la placa se sometió a agitación durante 30 min (120 rpm en agitador orbital *Minitron*, de *Infors*), y se cuantificó el número de células presentes en el sobrenadante respecto al número total de células (número de células sueltas + número de células pegadas). De esta manera se valoró el grado de adhesividad al sustrato en el desarrollo temprano.

3.8.4.7 Preparación de medios condicionados

Para la obtención de caldos condicionados se siguió el protocolo de Darmon y colaboradores (1978) con algunas modificaciones. 1×10^7 células/mL se sometieron a ayuno durante el período de tiempo adecuado para cada experimento. El sobrenadante se centrifugó durante 3 min a $200 \times g$ para eliminar los restos celulares y se filtró con un poro de 0,45 µm. Este caldo se mantuvo a 4 °C o se congeló.



4

Resultados

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PADA

El alelo *padA*⁻ codifica una proteína truncada en el carboxilo terminal, PadAD276, a la que le faltan 25 de los 301 aminoácidos de la proteína original. *padA*⁻ se describió como un mutante termosensible, con función residual a la temperatura permisiva (22°C), que se pierde por completo a la temperatura restrictiva (27°C) (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Se han detectado trazas de ARNm de *padA* en el mutante *padA*⁻ en células en crecimiento y se supuso que este ARNm codificaba la proteína residual activa a 22°C (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta el momento, no se había podido demostrar la presencia de la proteína truncada PadAD276 en la cepa *padA*⁻; ya que no existía anticuerpo para su detección. Lo que también impidió demostrar la expresión de las proteínas mutantes en residuos (unión a NAD⁺(H)/NADP⁺(H) o a factor GATA) que confirmaban el modelo estructural de PadA (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008, Núñez-Corcuera, 2008). Para responder a estas cuestiones esenciales, se generó un anticuerpo policlonal contra la proteína PadA completa (301 aminoácidos), que reconoce la proteína PadA, revelando una banda del tamaño esperado (\approx 33 kDa). El suero inmune, que fue purificado por sustracción para aumentar su especificidad, se empleó de forma rutinaria a una dilución 1:500 en ensayos de *western blot*. Los detalles de la optimización del suero están descritos en materiales y métodos.

4.1.1 La proteína truncada PadAD276 está ausente en el mutante *padA*⁻

Se había descrito que la sobre-expresión de la proteína truncada codificada por *padA*⁻, PadAD276, no complementa el fenotipo mutante en desarrollo, pero tampoco da lugar a ningún fenotipo al expresarla en el fondo silvestre (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Para analizar si el alelo *padA*⁻ era no funcional o guardaba alguna función residual se comprobó la presencia de la proteína de PadAD276 en la cepa *padA*⁻. Como se observa en la Figura 17, no se detectó PadAD276 en 60 μ g de extracto de la cepa mutante *padA*⁻, mientras PadA sí se detecta en la misma cantidad de proteína total de células AX2. Se transfirieron cantidades

crecientes de extracto proteico de *padA*⁻ para tratar de detectarla, pero no se consiguió (no mostrado). Por el contrario, como se observa en la misma figura, el anticuerpo sí detecta la proteína PadAD276 sobre-expresada en el fondo genético *padA*⁻ (también en el fondo silvestre, no mostrado). La estabilidad de la proteína truncada es baja y se degrada tanto en el fondo *padA*⁻ (Fig. 17) como en el fondo AX2 (no mostrado).

Estos resultados demuestran que PadA está ausente en el mutante *padA*⁻; por lo que, probablemente, es un mutante de falta de función.

Al disponer del anticuerpo anti-PadA, validado para *western blot*, se realizaron extracciones de proteína con fosfatasa λ para comprobar si existía una modificación post-traducciona en forma de fosforilación. Como control negativo se incubó un extracto similar con un inhibidor de fosfatasas (Na_3VO_4), pero no se observaron cambios apreciables en el tamaño de las bandas reveladas (no mostrado) por lo que no parece probable que PadA sufra una fosforilación post-traducciona.

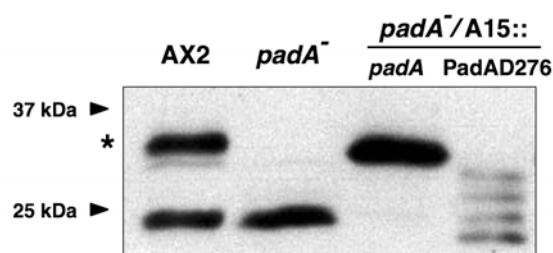


Figura 17. La proteína truncada PadAD276 es inestable. *Western blot* de células en crecimiento exponencial que sobreexpresan PadA y PadAD276 revelado con antiPadA. Extracto proteico de células AX2 (60 μg), *padA*⁻ (60 μg), *padA*⁻/A15::*padA* (0,6 μg), y *padA*⁻/A15::*padAD276* (6 μg). El * marca la posición de la proteína PadA.

4.1.2 Detección de PadA por inmunocitoquímica

El suero antiPadA se empleó para detectar la localización subcelular de la proteína PadA con técnicas inmunocitoquímicas. Las células fijadas e incubadas con una dilución 1:50 de antiPadA revelaron una señal específica en la cepa silvestre, sin embargo, la señal era idéntica en la cepa mutante *padA*⁻ (Fig. 18 A y B), donde debería estar ausente de acuerdo con los resultados obtenidos por *western blot*, (posiblemente se trata de las proteínas que adicionalmente reconoce el suero anti-PadA y que no son PadA). Se hibridó la cepa *padA*⁻/A15::*padA* con una dilución del anticuerpo, 1:500. En condiciones en las que la proteína

PadA (verde en la Fig. 18) apenas se detecta en el mutante *padA*⁻, la señal es muy intensa en la cepa *padA*⁻/A15::*padA* (Fig. 18 C y D). Sin embargo, no fue posible determinar la localización subcelular de PadA, ya que al tratarse de una sobreexpresión, la localización natural puede estar alterada debido al exceso de proteína presente en el célula.

Se diseñó un nuevo péptido correspondiente a los 25 últimos aminoácidos del carboxilo terminal de PadA para generar otro anticuerpo, pero desgraciadamente, el suero resultante tampoco fue adecuado para técnicas inmunocitoquímicas.

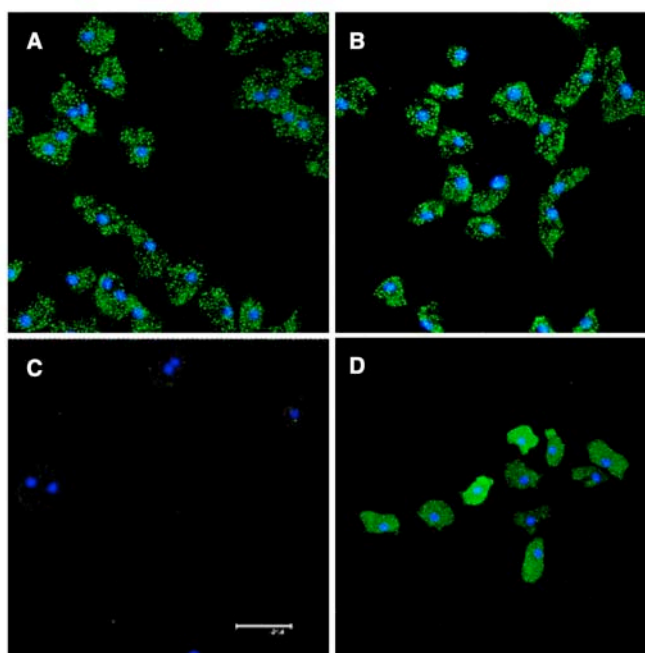


Figura 18. Localización subcelular de PadA detectada por inmunofluorescencia. Células de AX2 (A) y *padA*⁻ (B) incubadas con una dilución 1:50 del anticuerpo anti-PadA. Células de *padA*⁻ (C) y *padA*⁻/A15::*padA* (D) incubadas con 1:500 del anticuerpo anti-PadA. Las fotografías son proyecciones de los planos que se obtuvieron por microscopía confocal.

4.1.3 Patrón de expresión de PadA durante el desarrollo de *D. discoideum*

EL ARNm de *padA* durante el desarrollo está regulado, se expresa durante el crecimiento vegetativo y tiene su expresión máxima durante las primeras horas del desarrollo para disminuir a partir de las 6 horas y volver a aumentar en torno a la culminación (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Este resultado se corroboró por RT-PCR semi-cuantitativa y cuantitativa en tiempo real, a partir de ADNc obtenido, de 0 a 11 h, cada 2 h, a partir de estructuras del desarrollo de AX2 ($2,51 \times 10^6$ cells/cm² en filtros de nitrocelulosa). Como se observa en el panel izquierdo de la Figura 19. A, la expresión máxima tiene lugar en

las 2 primeras horas del desarrollo para después disminuir de manera considerable. Esto se corroboró por cuantificación de la expresión (panel derecho de la Fig. 19. A), donde el nivel de expresión cae ≈ 10 veces entre 0 h y 4 h. Se comprobó que el comportamiento de la proteína PadA seguía un patrón similar mediante *western blot*. PadA se detectó durante el crecimiento vegetativo, tal y como se muestra en la Figura 19. B (0 h) y su expresión se mantuvo constante hasta, aproximadamente, las 6 horas del desarrollo, donde comenzó a disminuir. Esta disminución es posterior en el tiempo respecto a la caída en el nivel de transcripción y puede deberse a una diferente vida media. No se observó aumento de proteína en torno a la culminación (16-18 h) tal como ocurre con el ARNm (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008), lo que puede deberse a que el ARNm se acumule.

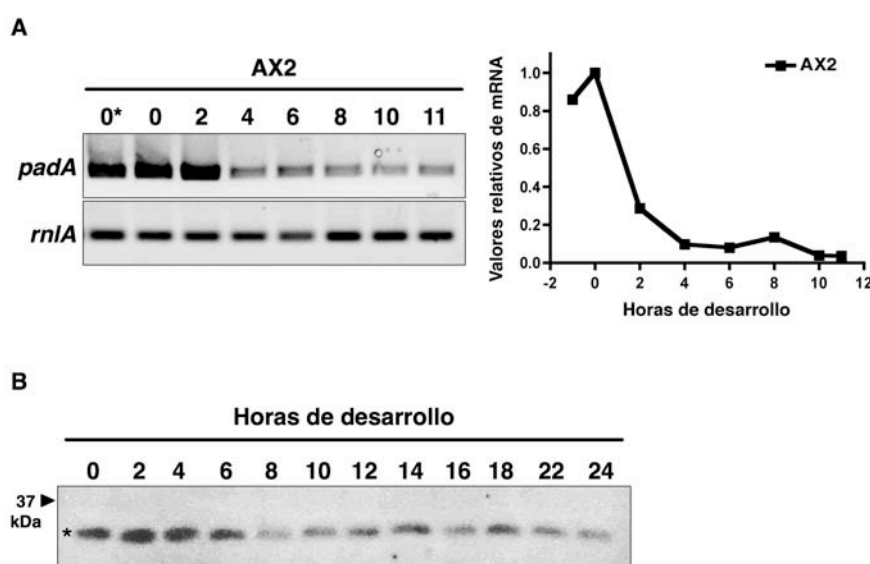


Figura 19. Expresión durante el desarrollo. A) Niveles del ARNm de *padA* en células AX2 durante el inicio del desarrollo (0-11 h; 0*: crecimiento vegetativo) por RT-PCR semi-cuantitativa (A. izquierda.) y RT-PCR cuantitativa (A. derecha). La cantidad de ADNc se normalizó con la del gen ribosomal *rnlA*. **B)** Patrón de expresión de la proteína PadA (*) durante el desarrollo (0-24 h).

4.1.4 Búsqueda de proteínas que interaccionan con PadA

Se diseñaron dos análisis diferentes para encontrar posibles proteínas que interaccionan con PadA: inmunoprecipitación y un análisis de doble híbrido (*Hybrigenics*). Desgraciadamente, ninguna de las dos aproximaciones ofreció resultados positivos.

4.1.5 PadA es el homólogo de NmrA en *Dictyostelium discoideum*

Se describió que PadA contiene un dominio NmrA (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008), pero no se disponía de evidencias suficientes para afirmar que fuera el homólogo de NmrA en *D. discoideum*. De hecho, existen otras 8 proteínas con dominio NmrA presentes en el genoma de *D. discoideum* que mostraban mayor similitud de secuencia con NmrA/NMRAL1 (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Se estableció una colaboración con el grupo de la Dra. Cristina Vega (CIB-CSIC) para analizar la familia NmrA-like de *D. discoideum*. En primer lugar, se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias aminoacídicas de PadA, NmrA, NMRAL1 (HSCARG) y las 8 proteínas con dominio NmrA-like presentes en el genoma de *D. discoideum* (DDB_G0292738, DDB_G0268206, DDB_G0286605, DDB_G0275053, DDB_G0291732, DDB_G0272688, DDB_G0267842, DDB_G0274161) (Fig. 20) empleando diferentes programas para obtener el mejor alineamiento posible. A pesar de la divergencia existente, se aprecian patrones conservados en los motivos funcionales importantes, como los residuos de unión a dinucleótidos, T18G19 en PadA (Fig. 20).

Se realizó un análisis filogenético de las proteínas *NmrA-like* de *D. discoideum* para reconstruir la historia evolutiva de esta familia de proteínas en *D. discoideum*. Como se observa en el cladograma de la Figura 21, todas las proteínas excepto PadA, DDB_G0268206 y DDB_G0292738 se agrupan en un clado independiente de NmrA y NMRAL1, lo que indica una relación evolutiva distante. Sin embargo, PadA, junto a estas dos secuencias muy similares entre sí, forma un clado claramente separado del resto, junto a NmrA y NMRAL1. Las secuencias DDB_G0268206 y DDB_G0292738 podrían ser fruto de una duplicación reciente, debido a su alta similitud (>90% de identidad de secuencia entre ellas, sólo un 30% respecto a PadA). Las evidencias estadísticas que apoyan la relación evolutiva entre PadA y NmrA/NMRAL1 son muy consistentes e indican que PadA es el homólogo de NmrA/NMRAL1 en *D. discoideum*. Están validadas por dos métodos diferentes de inferencia filogenética, basados en inferencia Bayesiana y la estimación de máxima verosimilitud (apartado 3.6 de Material y Métodos).

El trabajo de nuestros colaboradores ha permitido también establecer que PadA une específicamente el cofactor NADPH, discriminando el resto de formas no fosforiladas u oxidadas (F. Fernández y C. Vega, comunicación personal). La preferencia por NADPH concuerda con la posición filogenética más cercana a NMRAL1 mostrada en el cladograma, ya que ambas proteínas unen y se estabilizan con NADPH, a diferencia de NmrA que une NAD⁺/NADP⁺ (Zheng *et al.*, 2007; Lamb *et al.*, 2003).

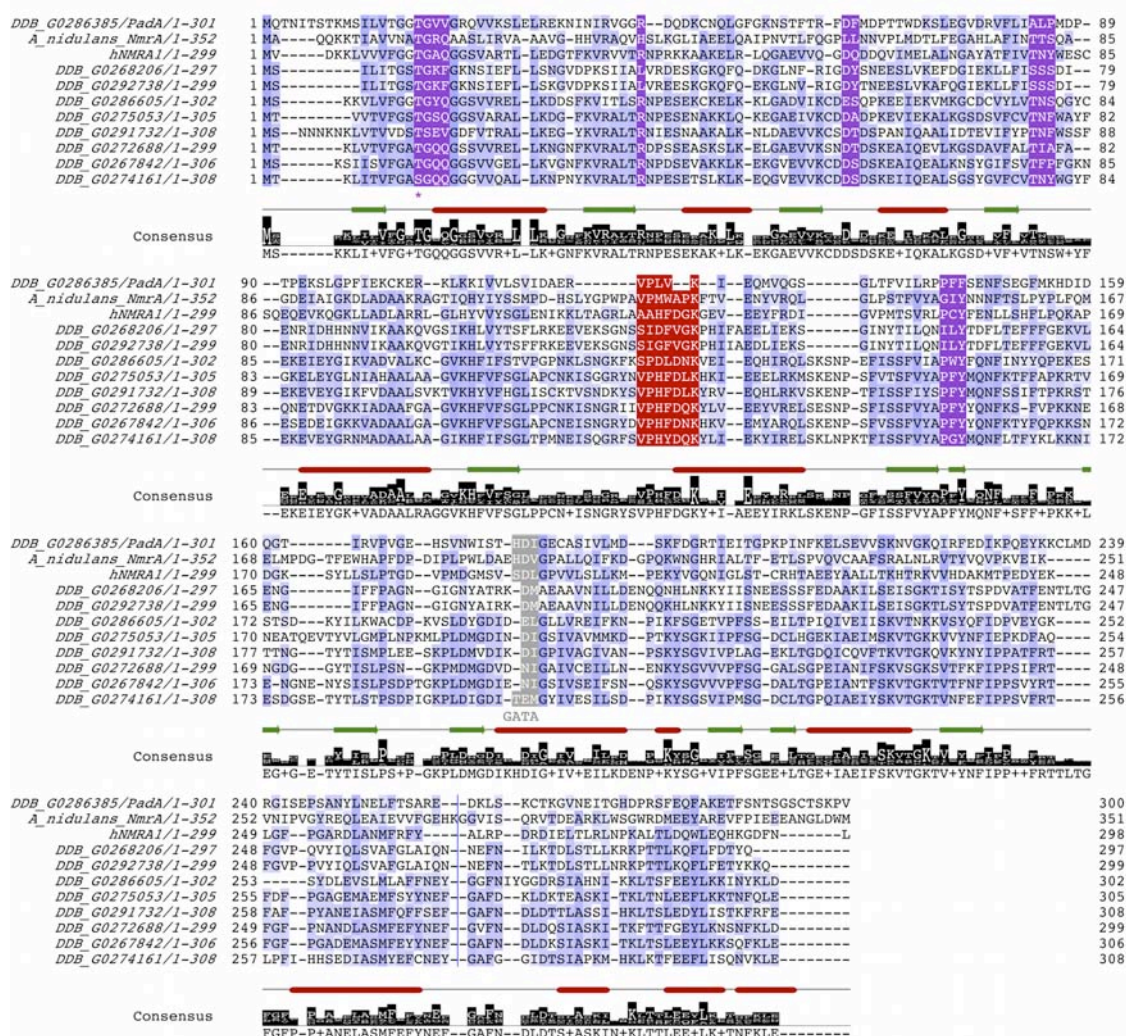


Figura 20. Alineamiento múltiple de la proteína PadA, las otras proteínas *NmrA-like* de *Dictyostelium*, NmrA de *A. nidulans* y NMRAL1 de humanos. La secuencia consenso aparece en la parte inferior y su tamaño refleja el grado de conservación. Las anotaciones referentes a la estructura secundaria (en verde y rojo) corresponden a la estructura conocida y resuelta de NmrA (PDB ID 1TI7). Los residuos destacados corresponden a motivos funcionalmente relevantes; los residuos de unión a cofactor están indicados en morado oscuro, con el residuo T18 marcado con un asterisco; los residuos catalíticos aparecen en rojo y los de unión a factor GATA, en gris. La línea vertical azul presente en la posición PadA 259 representa una inserción de 39 aminoácidos presente únicamente en NmrA y que se ha omitido para favorecer la claridad.

significativos en la cantidad de PadA presente en ambos medios. La diferencia que se aprecia en el punto de los 15 min puede ser indicativa de una tendencia, pero la repetición, 5 veces, del experimento no dio valores significativos (Fig. 22.B). Se repitió el mismo experimento con tiempos de incubación más largos: 6 h, 44 h, 66 h y 72 h. No se observó cambio alguno por la presencia de NH_4Cl en ninguno de los tiempos analizados (no mostrado). De las observaciones realizadas se puede concluir que, en estas condiciones, la expresión de la proteína PadA no está regulada por la presencia o ausencia de amonio en el medio, a diferencia de su homólogo NmrA.

El siguiente abordaje fue determinar si la localización subcelular de PadA variaba en función de la disponibilidad de amonio. Dada la baja idoneidad de anti-PadA en experimentos de inmunocitoquímica, se emplearon las cepas AX2/A15::*padA* y AX2/A15::*padAGFP*, que sobreexpresan PadA fusionada o no a GFP. Las células fueron sometidas a diferentes condiciones de cultivo (medio HL5, medio mínimo con amonio, sin amonio, ausencia de nutrientes, etc.) y se observaron al microscopio confocal, pero no se detectó un cambio de localización subcelular de la proteína en ninguna de las condiciones testadas (no mostrado). Sin embargo, al estar PadA sobreexpresada, estos experimentos no son concluyentes.

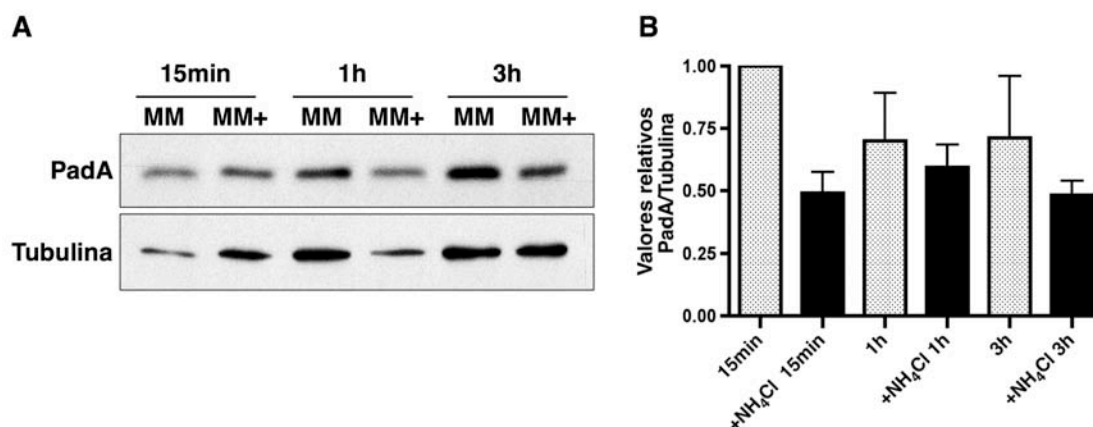


Figura 22. Western blot y cuantificación de la proteína PadA a partir de células AX2 incubadas en medio mínimo. Se incubaron durante 15 min, 1 h y 3 h en presencia o no de 53,5 mg/L NH_4Cl . **A)** Western Blot representativo a partir de 30 μg de proteína obtenida de 1×10^7 células. **B)** Cuantificación densitométrica de 5 experimentos independientes.

4.2.2 PadA es necesaria para el crecimiento en medio mínimo

D. discoideum es capaz de crecer en medios definidos que contienen los aminoácidos esenciales y algunos condicionales para *D. discoideum*, pero sin glutamina ni amonio (Marin, 1976; Franke y Kessin, 1977). Para comprobar si la presencia de amonio modificaba la velocidad de crecimiento del mutante *padA*⁻ se crecieron células de AX2 y *padA*⁻ en medio completo (HL5) como control, en medio mínimo sin NH₄Cl y en medio mínimo con NH₄Cl. Conviene recordar aquí, aunque ya se ha mencionado, que *padA*⁻ crece más despacio en HL5 que el tipo silvestre (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Se inoculó el mismo número de células (2×10^5 células/mL) en los distintos medios y se cuantificó la densidad celular hasta alcanzar la fase estacionaria. Se estimaron los tiempos de generación en fase exponencial. El tiempo de generación de AX2 en medio HL5 es de $9,66 \pm 0,82$ h y el de *padA*⁻ de $13,37 \pm 2,31$ h (Fig. 23. A). En medio mínimo, el tiempo de duplicación aumenta hasta $24,3 \pm 8,3$ h en el silvestre, y *padA*⁻ apenas se divide, con un tiempo de duplicación de $44,6 \pm 16$ h. La alta desviación estándar en los valores obtenidos en medio mínimo en ambas cepas, denota una gran variabilidad en los tiempos de generación en estas condiciones, pero claramente AX2 y *padA*⁻ crecen mucho peor en este medio limitado que en HL5. No se observaron cambios significativos en el tiempo de generación en medio mínimo dependientes de la presencia de NH₄Cl en ninguna de las dos cepas (Fig. 23. A). Por este motivo, en los experimentos sucesivos se empleó el medio mínimo suplementado con NH₄Cl como medio mínimo estándar. A tiempos más largos, el cultivo de AX2 en medio completo se satura al cuarto día y su crecimiento cae drásticamente un día más tarde (Fig. 23. B). Los cultivos de *padA*⁻, al crecer más despacio no se saturan hasta el séptimo día, para morir rápidamente el octavo (Fig. 23. B). Ambas cepas en medio completo alcanzan idéntica densidad celular máxima antes de entrar en la fase de muerte. En medio mínimo, AX2 presenta un crecimiento tan lento que no llega a la saturación hasta el noveno día, y a partir de aquí las células van muriendo poco a poco (Fig. 23. B). *padA*⁻ apenas crece en medio mínimo y, en el duodécimo día de cultivo, sigue prácticamente con la misma densidad celular inicial (Fig. 23. B). Posteriormente, las células mueren sin llegar a saturar el medio de cultivo. Estos datos sugieren que la presencia de PadA es necesaria para el crecimiento en condiciones limitantes como el medio mínimo.

Para profundizar en la caracterización de la posible función de PadA durante el crecimiento, se midió la velocidad de crecimiento de las cepas AX2/A15::*padA*, que expresa constitutivamente el gen *padA* nativo; *padA*⁻/A15::*padA*, la cepa mutante complementada, y las cepas que sobreexpresan la proteína troncada PadAD276 en ambos fondos (*padA*⁻/A15::*padAD276* y AX2/A15::*padAD276*).

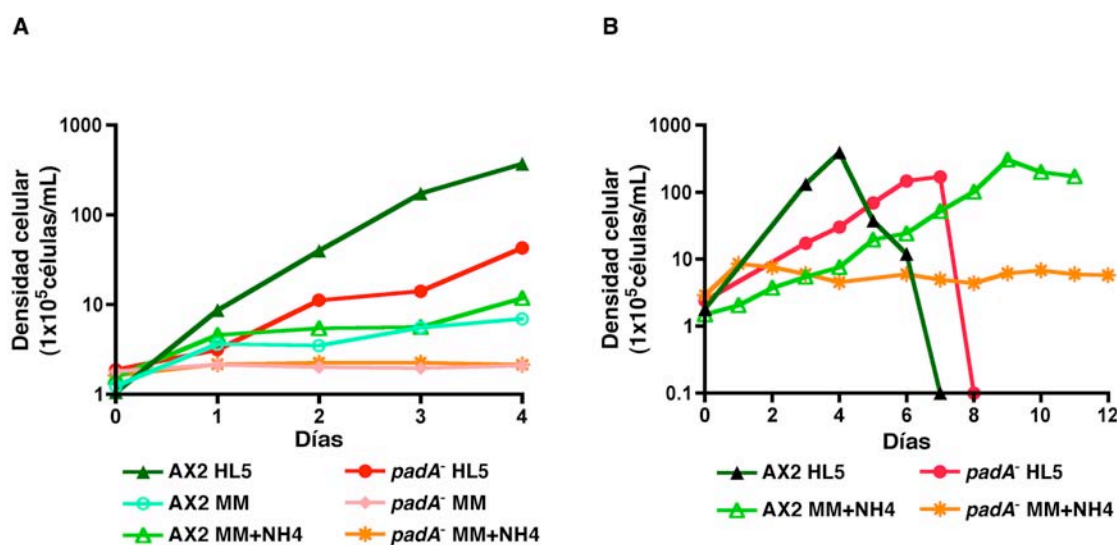


Figura 23. Curvas de crecimiento de AX2 y *padA*⁻ en medio HL5, medio mínimo y medio mínimo suplementado con 53,5 mg/L NH₄Cl. Las células en crecimiento exponencial se transfirieron al medio indicado a una densidad inicial de 2-4 x 10⁵ células/mL y se cuantificó la concentración celular cada 24 h con un hemocitómetro. Se representa AX2 en tonos verdes y *padA*⁻ en tonos rojos. **A)** Curva de crecimiento a tiempos cortos (0-4 días). **B)** Curva de crecimiento a tiempos largos (0-12 días).

La cepa *padA*⁻/A15::*padA* (tiempo de generación: 9,85 ± 1,7 h) creció en HL5 a la misma velocidad que AX2 o AX2/A15::*padA* (tiempo de generación: 9,69 ± 0,89 h) en medio completo (Fig. 24. A). Sorprendentemente, la sobreexpresión del gen *padA* nativo en ambos fondos es letal en medio mínimo; las células prácticamente no se dividen y mueren entre el cuarto y el sexto día de cultivo (Fig. 24. A). Este hecho planteó la duda de si esta muerte era debida a la gentamicina empleada en la selección de los transformantes portadores de la construcción A15::*padA*, sin embargo la muerte también ocurría en células incubadas sin antibiótico (tras seleccionarlas previamente con él; no mostrado). Ni el exceso de glucosa ni la ausencia de NH₄Cl revirtió este fenotipo (no mostrado), y todo indica que la muerte de las células portadoras de A15::*padA* está causada específicamente por el exceso de proteína PadA. Por otro lado, la expresión constitutiva de la forma trunca, PadAD276, que es inestable (ver Fig. 17), no altera el tiempo de duplicación de AX2 ni *padA*⁻ (Fig. 24. B).

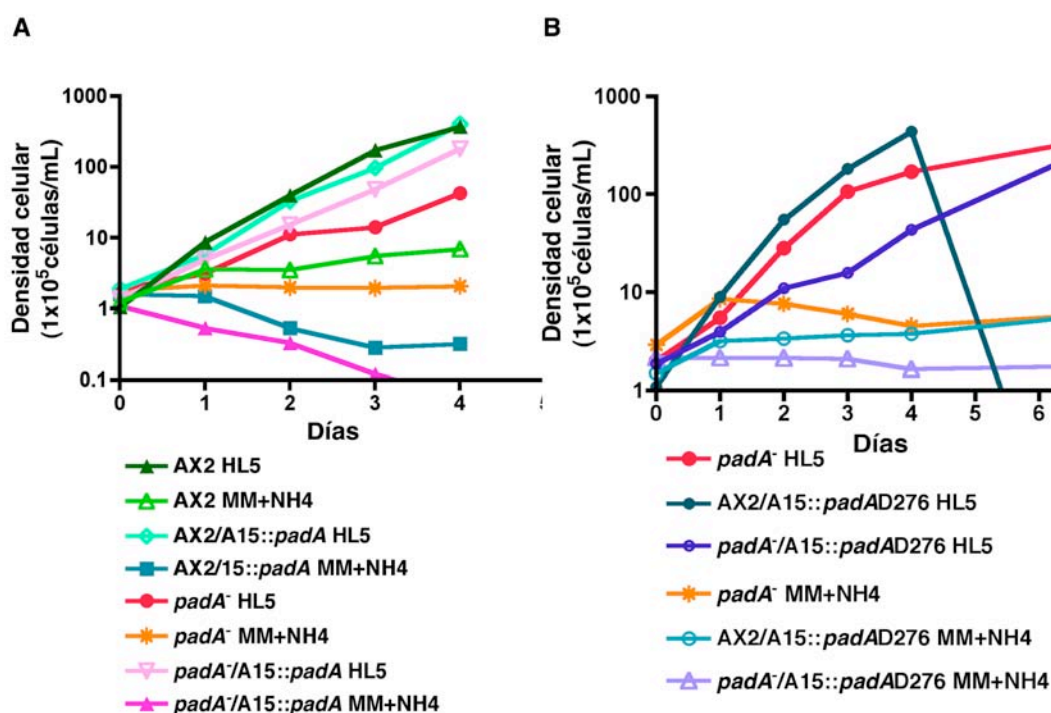


Figura 24. Curvas de crecimiento de las cepas AX2 y *padA*⁻ que expresan constitutivamente *padA* y *padAD276*. Crecimiento en medio completo (HL5) o medio mínimo (MM). **A)** Expresión de A15::*padA*. **B)** Expresión de A15::*padAD276*. Las células de todas las cepas, en crecimiento exponencial, se transfirieron a medios de cultivo con las condiciones indicadas y se midió la densidad celular cada 24 h con un hemocitómetro.

4.2.3 Análisis por micromatrices de ADN de los genes regulados por PadA

Para intentar dilucidar el papel de PadA en el crecimiento vegetativo o, al menos, acotar su función, se recurrió a un análisis por micromatrices de ADN, comparando el transcriptoma de *padA*⁻ respecto al de AX2 en dos condiciones diferentes: medio completo (HL5) y medio mínimo (MM). El medio mínimo reproduce una situación no óptima de crecimiento, pero sin llegar al ayuno de nutrientes (Franke y Kessin, 1977). Este análisis se llevó a cabo, durante la estancia en el laboratorio del Dr. Eichinger, en la Universidad de Colonia, Alemania. Las micromatrices empleadas no son comerciales; se preparan en el laboratorio del Dr. Eichinger y abarcan aproximadamente el 50% del genoma de *D. discoideum*, 5906 genes (5423 EST-s; 450 genes; 33 controles, ver apartado 3.7 de Material y métodos). Se emplearon tres lotes independientes de ADNc para cada cepa y condición, cada uno de ellos analizado dos veces (uno con cada fluoróforo). En total, el ARNm de cada cepa y condición se analizó en 6 micromatrices independientes. Los datos numéricos obtenidos del análisis se normalizaron

con programas estadísticos específicos y se identificaron los genes expresados de manera diferencial (ver apartado 3.7 de Material y Métodos).

4.2.3.1 Genes diferencialmente regulados en HL5 y MM en *padA*⁻

El umbral de expresión diferencial que se ha aplicado en el análisis es de 1,3; por lo tanto, no se han considerado los genes modificados al alza o a la baja con una diferencia inferior a 1,3 veces, respecto a AX2. En términos numéricos, el análisis estadístico muestra que en medio HL5 76 genes están diferencialmente regulados, de los cuales 26 lo están al alza y 50, a la baja. En medio mínimo, este número aumenta hasta 167, de los cuales 111 están regulados al alza y 55, a la baja (Tabla 4).

Tabla 4. Número de genes diferencialmente regulados en *padA*⁻.

Umbral	HL5	MM
↑		
Total	26	111
≥ 1,5	7	21
≥ 1,3	19	90
↓		
Total	50	55
≥ 1,5	17	15
≥ 1,3	33	40

Tabla 4. Número de genes diferencialmente regulados en células *padA*⁻ cultivadas en medio completo (HL5) o medio mínimo (MM).

Al comparar las dos listas de genes modificados (HL5 y MM), se observa que entre los genes regulados al alza (verdes en Fig. 25) el 80,1% (105) se manifiesta en MM, y sólo el 15,3% (20) en HL5. Únicamente el 4,6% (6) de los genes regulados al alza son comunes a las dos condiciones experimentales. El número de genes regulados a la baja (rojos en Fig. 25) es similar en las dos condiciones, un 45,65% (42) corresponden a medio mínimo y 40,22% a medio completo (37). En este caso el número de genes comunes a las dos condiciones es del 14,13 % (13).

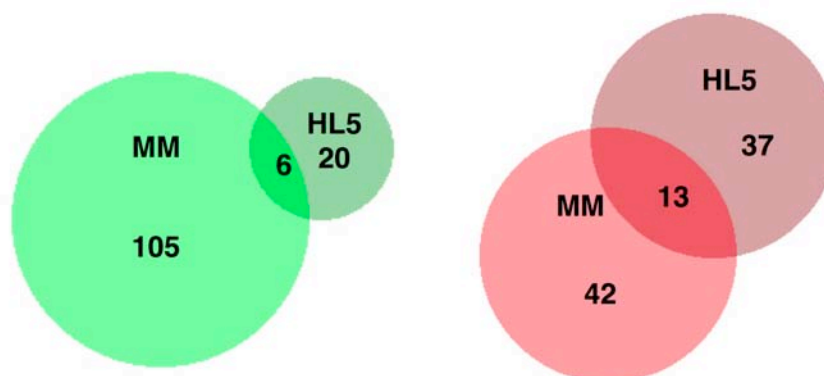


Figura 25. Diagramas de *Venn* que muestran el número de genes diferencialmente regulados en células *padA* crecidas en HL5 o MM. En verde el número de genes regulados al alza y en rojo, a la baja. HL5: medio compelto. MM: medio mínimo. En la intersección de los círculos se muestra el número de genes comunes a las dos condiciones experimentales.

4.2.3.2 Clasificación de los resultados de las micromatrices en categorías del Gene Ontology

Los resultados de las micromatrices, organizados en 4 grupos, se analizaron usando el sistema GOAT (Gene Ontology Analysis Tool), adaptado a *D. discoideum* (Xu y Shaulsky, 2005). Los genes correspondientes a los cuatro grupos (regulados positivamente en HL5 (1) o en MM (2), negativamente en HL5 (3) o en MM (4)) se sometieron por separado al análisis. Los datos obtenidos del GOAT se revisaron manualmente para descartar los genes redundantes, las subcategorías con un único representante o con una pobre significancia estadística (valor-P superior a 0,05). Los datos finales se muestran en las Tablas 5 y 6.

4.2.3.2.1 GO de los genes regulados al alza

Entre los genes regulados al alza en **HL5** (Tabla 5), no se pueden extraer conclusiones importantes, ya que únicamente 5 de los 26 genes (19,2%) regulados al alza están incluidos en el análisis (debido a que hay genes a los que no se les ha asignado ninguna categoría GO todavía). Únicamente la *adhesión celular* (en la categoría de “**Proceso biológico**”) está enriquecida, con dos representantes: *cf50* y *tgrC*. La localización extracelular (categoría “**Componente celular**”) incluye a los únicos 5 genes que identifica este análisis, entre ellos está *amyA* (α amilasa), implicada en la biosíntesis de la trehalosa, además de los mencionados *cf50* y *tgrC*.

En **medio mínimo (MM)**, (Tabla 5) sólo se pudieron clasificar un 24,3% de los 111 genes regulados al alza en, al menos, una de las tres categorías GO. Existe un claro enriquecimiento en los genes que codifican proteínas implicadas en *procesamiento y metabolismo del ARN* (categoría “**Proceso biológico**”), que incluye a 5 de los 111 genes regulados (4,5%). En la categoría GO “**Función molecular**” predominan genes que codifican funciones *hidrolasa y fosfatasa*, pero destaca la subcategoría *unión a ácidos nucleicos*, que incluye el 12,6% de todos los genes (14 de 111), y donde se incluyen factores de transcripción como *gtaQ*, uno de los 24 factores putativos GATA de *D. discoideum*, *crtf* (regulador de *carA*), *mybQ* y *dstB* (STATb) (Mu *et al.*, 2001; Otsuka y Van Haastert, 1998; Fukuzawa, 2006; Zhukovskaya *et al.*, 2006). Además, otros genes implicados en la transición GDT están regulados al alza, como *gpaA* (subunidad $\alpha 1$ de proteína G) y *cmfA* (receptor de CMF), y una quinasa esencial en la diferenciación como *dhkA* (Bakthavatsalam *et al.*, 2007; Deery *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1996). En la categoría de “**Componente celular**” hay una tendencia a la localización en *esplíceosoma* y en *endosoma tardío* que concuerda con el “**Proceso biológico**” enriquecido.

4.2.3.2.2 GO de los genes regulados a la baja

En células crecidas en **HL5** un 48% de los genes se pudieron clasificar en, al menos, una de las tres categorías GO (Tabla 6). La categoría “**Proceso biológico**” incluye 7 genes que aparecen en subcategorías, entre las que destacan *metabolismo de diversos azúcares*, *síntesis y metabolismo de purinas-ribonucleótidos* y *regulación de la polimerización proteica*. Entre estos 7 genes se incluyen los que codifican la 6-fosfofructoquinasa (*pfkA*), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*g6pd*) y la α -manosidasa (*manA*). En la categoría de “**Función molecular**”, que incluye sólo 4 genes (10,8%), son relevantes las funciones *transaminasa/tranferasa* y *carboxilasa*. En la categoría GO “**Componente celular**” existe un enriquecimiento en *citoplasma*, *vesícula* y *vesícula endocítica*, que incluye 19 genes (51%), entre los que destacan el gen de adhesión celular *cadA*, *g6pd*, *manA*, *pfkA*, *grp24* (proteína *heat shock* relacionada con la glucosa), varios genes implicados en biosíntesis de purinas (*purC*, *purE*, etc.) y *sibA* (*similar to integrin- β* , proteína de adhesión al sustrato).

Entre los genes regulados a la baja en **MM (medio mínimo)**, se clasificaron un 67% (36) de los genes (Tabla 6). En la categoría “**Proceso biológico**” se incluyen 13 genes (30,9%) y destacan diversas subcategorías relacionadas con *síntesis y metabolismo de purinas y nucleótidos*, como ocurría en HL5, además de *síntesis/metabolismo de pigmentos* y *respuesta a estrés*, que incluye proteínas “*heat shock*”. En la categoría “**Función molecular**” asociada sólo se engloban el 14,3% (6) de los genes regulados en esta categoría y destacan la *actividad glicina hidroximetiltransferasa*, *actividad carboxilasa* y *unión a NAD/NADH*. Dentro de esta

última subcategoría están *serA* (3-fosfoglicerato deshidrogenasa) y una epimerasa/deshidratasa no caracterizada con dominio de unión a NAD, que comparte similitud con el dominio de unión a cofactor con *PadA*. En la categoría de “**Componente celular**”, que incluye el 64,3% de los genes, hay mucha heterogeneidad (Tabla 6).

Tabla 5. Categorías GO (“Proceso biológico”, “Función molecular” y “Componente celular”) enriquecidas entre los genes regulados al alza en *padA*.

		GO_ID	List	Total	Fold	P_value	GO level	GO_Annotation
HL5	Biological process	GO:0007155	2	42	9,74	0.024	3	cell adhesion
		GO:0016337	2	14	29,23	0.005	4	cell\cell adhesion
		GO:0022610	2	42	9,74	0.024	2	biological adhesion
		GO:0031152	2	51	8,03	0.038	4	aggregation involved in sorocarp development
	Cellular component	GO:0005576	5	248	4,24	0.024	2	extracellular region
MM	Biological process	GO:0006396	5	59	4,05	0.013	7	RNA processing
		GO:0006397	4	31	6,16	0.007	7	mRNA processing
		GO:0008380	4	26	7,35	0.004	7	RNA splicing
		GO:0016071	4	39	4,90	0.014	7	mRNA metabolic process
	Molecular function	GO:0016817	8	175	2,07	0.046	4	hydrolase activity\, acting on acid anhydrides
		GO:0016818	8	173	2,09	0.044	5	hydrolase activity\, acting on acid anhydrides\, in phosphorus\containing anhydrides
		GO:0060089	4	56	3,23	0.043	2	molecular transducer activity
		GO:0003676	14	330	1,92	0.018	3	nucleic acid binding
		GO:0017111	8	169	2,14	0.040	7	nucleoside\triphosphatase activity
		GO:0016462	8	173	2,09	0.044	6	pyrophosphatase activity
		GO:0004872	3	29	4,68	0.033	4	receptor activity
		GO:0004871	4	56	3,23	0.043	3	signal transducer activity
		GO:0016563	2	7	12,93	0.015	3	transcription activator activity
	Cellular component	GO:0005681	4	26	7,51	0.002	7	spliceosome
		GO:0005770	2	6	16,28	0.006	7	late endosome

Tabla 5. Listado de categorías y subcategorías GO enriquecidas en *padA* entre los genes regulados al alza en HL5 y en MM. Dentro de cada subcategoría GO se indica el número de genes de la lista (*list*) pertenecientes a esa subcategoría frente al número total de genes que conforman la subcategoría (*total*). Se muestra las veces que está enriquecida esa subcategoría y el índice estadístico que le corresponde (*P-value*). *GO level* es el grado de especificidad asignado a la subcategoría, a mayor especificidad del proceso, mayor valor numérico.

Tabla 6. Categorías GO (“Proceso biológico”, “Función molecular” y “Componente celular”) enriquecidas entre los genes regulados a la baja en *padA*.

	HL5	GO_ID	List	Total	Fold	P_value	GO level	GO_Annotation
HL5	Biological process	GO:0005996	3	46	4,79	0.025	4	monosaccharide metabolic process
		GO:0006066	4	69	4,26	0.014	3	alcohol metabolic process
		GO:0006144	2	9	16,32	0.006	6	purine base metabolic process
		GO:0006164	3	46	4,79	0.025	6	purine nucleotide biosynthetic process
		GO:0009126	3	9	24,49	0.000	6	purine nucleoside monophosphate metabolic process
		GO:0009127	3	8	27,55	0.000	7	purine nucleoside monophosphate biosynthetic process
		GO:0009150	3	25	8,82	0.005	6	purine ribonucleotide metabolic process
		GO:0009152	3	24	9,18	0.005	7	purine ribonucleotide biosynthetic process
		GO:0009156	3	9	24,49	0.000	7	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process
		GO:0009124	3	28	7,87	0.006	6	nucleoside monophosphate biosynthetic process
		GO:0009167	3	9	24,49	0.000	7	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process
		GO:0009260	3	27	8,16	0.006	6	ribonucleotide biosynthetic process
		GO:0019318	3	40	5,51	0.018	5	hexose metabolic process
		GO:0032271	2	19	7,73	0.027	7	regulation of protein polymerization
		GO:0008483	2	11	14,13	0.010	4	transaminase activity
	Molecular function	GO:0016769	2	12	12,95	0.012	3	transferase activity\, transferring nitrogenous groups
		GO:0016831	2	16	9,71	0.017	3	carboxyl-lyase activity
		GO:0005737	19	812	1,94	0.001	6	cytoplasm
	Cellular component	GO:0016023	12	264	3,77	0.000	7	cytoplasmic membrane\bounded vesicle
		GO:0030139	11	244	3,74	0.000	7	endocytic vesicle
		GO:0031410	12	266	3,74	0.000	7	cytoplasmic vesicle
		GO:0031982	12	284	3,50	0.000	3	vesicle
		GO:0031988	12	276	3,60	0.000	4	membrane\bounded vesicle
		GO:0044444	18	721	2,07	0.001	7	cytoplasmic part
		GO:0045335	11	238	3,83	0.000	7	phagocytic vesicle
		GO:0006144	3	9	22,21	0.001	6	purine base metabolic process
MM	Biological process	GO:0006163	4	51	5,23	0.021	5	purine nucleotide metabolic process
		GO:0006164	4	46	5,79	0.021	6	purine nucleotide biosynthetic process
		GO:0006457	5	75	4,44	0.021	7	protein folding
		GO:0006563	2	6	22,21	0.003	7	L\serine metabolic process
		GO:0006730	2	6	22,21	0.003	4	one\carbon metabolic process
		GO:0006753	4	76	3,51	0.030	6	nucleoside phosphate metabolic process
		GO:0006986	3	17	11,76	0.002	4	response to unfolded protein
		GO:0009069	2	12	11,10	0.022	6	serine family amino acid metabolic process
		GO:0009112	3	23	8,69	0.021	5	nucleobase metabolic process
		GO:0009113	2	2	66,63	0.001	7	purine base biosynthetic process
		GO:0009117	4	76	3,51	0.030	7	nucleotide metabolic process
		GO:0009124	4	28	9,52	0.001	6	nucleoside monophosphate biosynthetic process
		GO:0009126	4	9	29,61	0.000	6	purine nucleoside monophosphate metabolic process
		GO:0009127	4	8	33,31	0.000	7	purine nucleoside monophosphate biosynthetic process
		GO:0009150	4	25	10,66	0.001	6	purine ribonucleotide metabolic process
		GO:0009152	4	24	11,10	0.001	7	purine ribonucleotide biosynthetic process
		GO:0009156	4	9	29,61	0.000	7	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process
		GO:0009165	4	58	4,60	0.022	5	nucleotide biosynthetic process
		GO:0009167	4	9	29,61	0.000	7	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process
		GO:0009260	4	27	9,87	0.001	6	ribonucleotide biosynthetic process
		GO:0009607	4	69	3,86	0.027	3	response to biotic stimulus
		GO:0034404	3	29	6,89	0.021	7	nucleobase\, nucleoside and nucleotide biosynthetic process
		GO:0034654	3	29	6,89	0.021	6	nucleobase\, nucleoside\, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process
		GO:0042440	2	9	14,81	0.021	3	pigment metabolic process

	HL5	GO_ID	List	Total	Fold	P_value	GO level	GO_Annotation
		GO:0044271	4	53	5,03	0.021	5	nitrogen compound biosynthetic process
		GO:0046148	2	9	14,81	0.021	4	pigment biosynthetic process
		GO:0046483	5	99	3,37	0.022	4	heterocycle metabolic process
		GO:0051789	3	17	11,76	0.002	4	response to protein stimulus
		GO:0055086	5	94	3,54	0.022	5	nucleobase\, nucleoside and nucleotide metabolic process
	Molecular function	GO:0004372	2	4	36,96	0.001	6	glycine hydroxymethyltransferase activity
		GO:0051287	2	10	14,79	0.009	5	NAD or NADH binding
		GO:0016831	2	16	9,24	0.019	5	carboxy\-lyase activity
	Cellular component	GO:0005576	13	248	3,87	0.000	2	extracellular region
		GO:0005615	13	218	4,41	0.000	4	extracellular space
		GO:0005737	21	812	1,91	0.002	6	cytoplasm
		GO:0005813	4	77	3,84	0.019	7	centrosome
		GO:0005815	4	78	3,79	0.025	7	microtubule organizing center
		GO:0015630	4	85	3,48	0.030	7	microtubule cytoskeleton
		GO:0016023	12	264	3,36	0.000	7	cytoplasmic membrane\bounded vesicle
		GO:0030139	12	244	3,64	0.000	7	endocytic vesicle
		GO:0031410	12	266	3,33	0.000	7	cytoplasmic vesicle
		GO:0031982	12	284	3,12	0.001	3	vesicle
		GO:0031988	12	276	3,21	0.001	4	membrane\bounded vesicle
		GO:0042995	2	25	5,91	0.045	4	cell projection
		GO:0044421	13	221	4,35	0.000	3	extracellular region part
		GO:0044424	21	1107	1,40	0.034	5	intracellular part
		GO:0044444	18	721	1,85	0.007	7	cytoplasmic part
		GO:0045335	12	238	3,73	0.000	7	phagocytic vesicle

Tabla 6. Listado de categorías y subcategorías GO enriquecidas en *padA* entre los genes regulados a la baja en HL5 y en MM. Dentro de cada subcategoría GO se indica el número de genes de la lista (*list*) pertenecientes a esa subcategoría frente al número total de genes que conforman la subcategoría (*total*). Se muestra las veces que está enriquecida esa subcategoría y el índice estadístico que le corresponde (*P-value*). *GO level* es el grado de especificidad asignado a la subcategoría, a mayor especificidad del proceso mayor valor numérico.

4.2.3.3 Clasificación de los resultados de las micromatrices en categorías del Yeast ontology

Para completar el análisis de los datos de las micromatrices, se realizó una anotación manual de todos los genes diferencialmente regulados en HL5 y MM. La anotación se realizó empleando el sistema de clasificación en categorías funcionales de *Saccharomyces cerevisiae* adaptado a *D. discoideum* (Urushihara *et al.*, 2004). Tampoco este proceso nos permitió catalogar todos los genes modificados y, sólo un 51,32% de los genes regulados en HL5 y un 42,2% de MM obtuvieron una correspondencia funcional, lo que supone un número mayor de genes clasificados en HL5 respecto al análisis GO. A pesar de esta limitación, las Tablas 7 y 8 muestran el listado completo de los genes regulados en HL5 y MM respectivamente, y han sido completadas, para añadir aquellos genes que, aunque no tenían asignada una categoría funcional de manera automática, se les puede adjudicar una manualmente.

Como se observa en la Figura 26. A y Tabla 7., dentro de los genes diferencialmente regulados en medio **HL5**, y teniendo en cuenta que sólo el 51,32% de los genes se pudieron clasificar, es de destacar que el 23,7% de los genes (48,71% de los clasificados) están incluidos en la categoría “metabolismo”, principalmente metabolismo de aminoácidos y están regulados a la baja (88,9% de los incluidos en “metabolismo”), incluyendo *pfkA*, *manA*, *g6pd* y diferentes hidrolasas, carboxilasas, transferasas, etc. (Tabla 7). Además, genes implicados en “traducción”, “facilitación del transporte”, “respuesta a estrés” y “señalización celular” también están regulados a la baja. Dentro de los genes relacionados con la adhesión celular, observamos que *cadA* y *sibA* están regulados a la baja, mientras que *tgrC* se encuentra sobreexpresado en *padA*⁻.

En **MM** (Tabla 8 y Fig. 26. B), el 15,7% (26) de los genes regulados (y el 37,14% de los que se han clasificado) codifican proteínas de “metabolismo” y las más representadas son las implicadas en “metabolismo de aminoácidos” (50% (13) de todas las del metabolismo), reguladas tanto al alza como a la baja. Los genes del “metabolismo de carbohidratos y compuestos carbonados” están regulados en ambos sentidos y el resto de las categorías contienen muy pocos genes como para sacar conclusiones generales. En la Tabla 8, en el que figura el listado de los genes modificados en *padA*⁻, podemos destacar *pdiA*, inhibidor de la fosfodiesterasa extracelular, que está regulado a la baja en medio mínimo, así como factores de transcripción, como *mybQ*, *mybE*, *dstB*, *crtf* y *gtaQ*, todos ellos ligeramente sobreexpresados, como también aparece *gpaA*, el gen que codifica la subunidad Gα1.

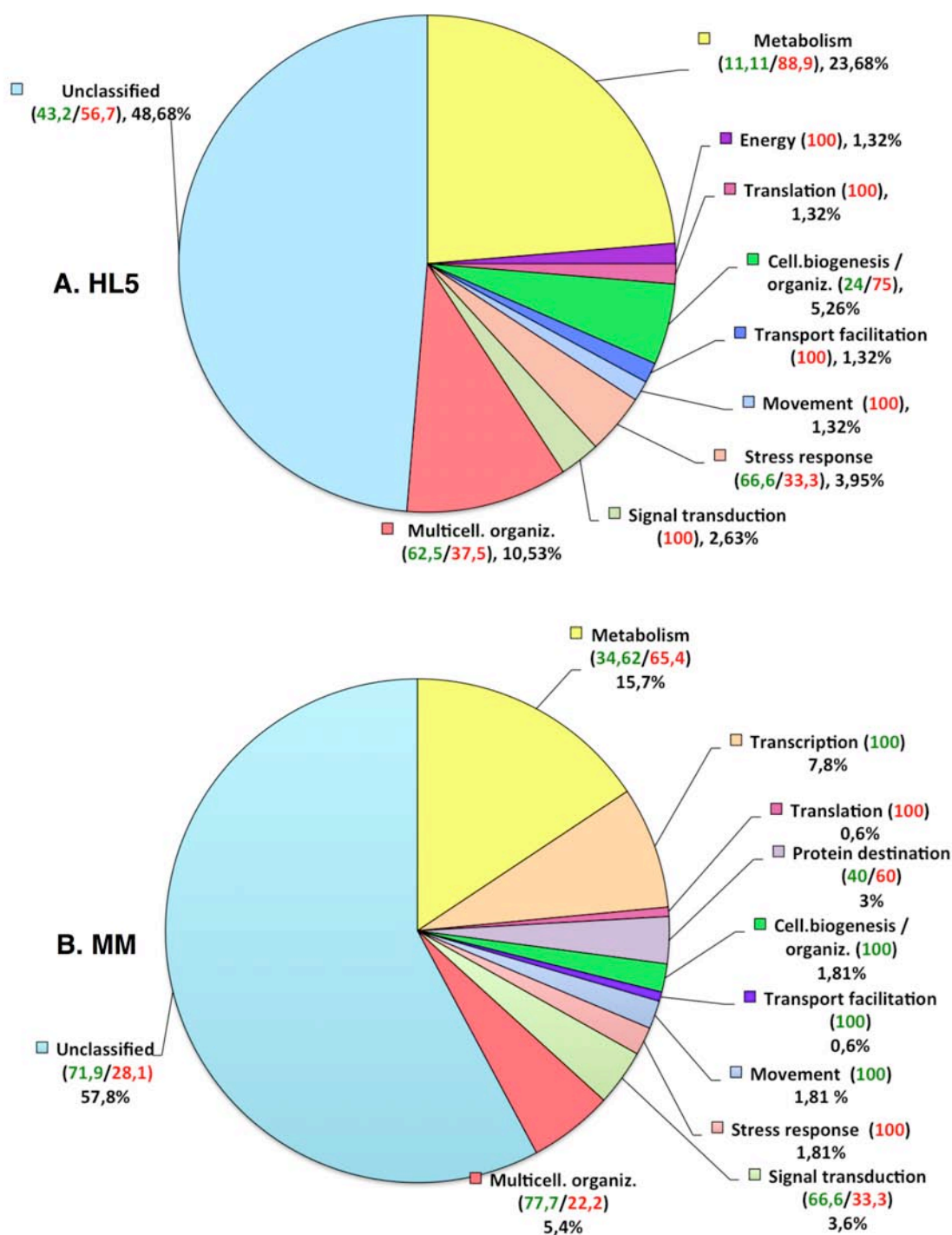


Figura 26. Representación gráfica de las categorías funcionales del *yeast ontology* alteradas en *padA*, entre los genes diferencialmente regulados en HL5 (A) y MM (B). En cada etiqueta figura el nombre de la categoría funcional junto al porcentaje de genes incluidos en la misma respecto al total de genes regulados (76 en HL5 y 176 en MM). En verde el porcentaje regulado al alza dentro de la categoría y en rojo, a la baja.

Tabla 7. Genes diferencialmente regulados en medio HL5 ordenados según categorías del *yeast ontology*.

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
1. Metabolism				
1.1 Amino-acid metabolism				
sli892	DDB_G0277087	<i>purH</i>	Inosine monophosphate cyclohydrolase	0,66
vsg855	DDB_G0274111	<i>pfkA</i>	6-phosphofructokinase	0,74
sse551	DDB_G0270298	<i>pctA</i>	Phosphoethanolamine-cytidyltransferase	0,75
ssh345	DDB_G0280317		Putative glutathione S-transferase	0,75
sle204	DDB_G0275263	<i>asnS1</i>	AsparaginyI-tRNA synthetase	0,75
vsh835	DDB_G0269148	<i>lkhA</i>	Leukotriene A4 hydrolase	0,75
sld508	DDB_G0268664	<i>aatA</i>	Aspartate aminotransferase	0,76
slc458	DDB_G0267380	<i>argE</i>	Acetylornithine deacetylase	0,74
1.3 Nucleotide metabolism				
ssk605	DDB_G0283987	<i>purC/E</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	0,62
vsd859	DDB_G0291926		Involved in sorocarp development.	0,62
ssg701	DDB_G0290121	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-glycine ligase	0,71
1.5 C-compound and carbohydrate metabolism				
slb737	DDB_G0281547	<i>amyA</i>	Putative alpha-amylase	1,38
m82822	DDB_G0292206	<i>manA</i>	Alpha-mannosidase.	0,72
vsi345	DDB_G0273131	<i>g6pd-2</i>	Glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase	0,71
1.6 Lipid, fatty-acid and isoprenoid metabolism				
slc627	DDB_G0268966	<i>lip1</i>	Lipase family member 1	1,49
vsg866	DDB_G0278607	<i>mvd</i>	Mevalonate 5-diphosphate Decarboxylase	0,62
vsh849	DDB_G0268064		Esterase/lipase/thioesterase domain-containing protein	0,72
1.7. Other				
af019986	DDB_G0282357	<i>pksB</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein.	0,74
2. Energy				
2.4. Tricarboxylic-acid pathway				
sli709	DDB_G0275311		Citrate synthase, mitochondrial	0,68
4. Translation				
4.1 Ribosomal proteins				
vsh237	DDB_G0294072	<i>mrps7</i>	Ribosomal protein S7, mitochondrial	0,75
6. Cellular biogenesis and organization				
6.1 Cell wall and plasma membrane				
ssm857	DDB_G0267846	<i>expl1</i>	Expansin-like protein	1,58
6.6 Mitochondrion				
vsg238	DDB_G0294068	<i>DidioMp27</i>	Ribosomal protein S3, C-terminal domain-containing protein	0,64
vsg622	DDB_G0294070	<i>DidioMp26</i>	Ribosomal protein S3, N-terminal domain-containing protein	0,70
vsd270	DDB_G0294054	<i>DidioMp36</i>	Unknown	0,72

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
7. Transport facilitation				
7.1. Ion				
vsg222	DDB_G0275713		DUF781 family protein	0,63
9. Movement				
9.1 Cytoskeletal components				
vsc229	DDB_G0292878	<i>wshA</i>	actin nucleation promoting factor (WASP / SCAR Homolog)	0,67
10. Stress response and cell rescue				
10.2 Stress response				
sle413	DDB_G0291568	<i>dnaja1</i>	DnaJ homolog. conserved molecular chaperone	1,41
sla176	DDB_G0280057	<i>grp94</i>	Glucose-Regulated Protein 94 Hsp90 family	0,66
10.5 Cell death and aging				
slb582	DDB_G0279539		RNA-binding region RNP-1 domain-containing protein	1,34
11. Signal transduction				
11.2 Second messenger formation				
slh684	DDB_G0268104	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	0,73
11.4 Regulation of G-protein activity				
l11593	DDB_G0293526	<i>racC</i>	Rho GTPase	0,75
12. Multicellular organization				
12.1 Cell interaction				
af258615	DDB_G0280531	<i>tgrC1</i>	Cell adhesion molecule. Plays a role in kin discrimination	1,38
slc529	DDB_G0269202	<i>gdcA</i>	gp64 and disintegrin-like, cysteine-rich protein	1,36
ssj287	DDB_G0285793	<i>cadA</i>	Calcium-dependent cell adhesion molecule-1	0,49
12.2 Cytodifferentiation				
ssd831	DDB_G0272098		TNF receptor-associated factor 5 (zinc ion binding)	0,53
12.3 Morphogenesis				
slg565	DDB_G0273175	<i>cf50-1</i>	Component of the counting factor (CF) complex	1,69
ssb372	DDB_G0292808	<i>cspB</i>	Culmination specific prot 45D.	1,38
sle639	DDB_G0287055	<i>vps13F</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein	1,32
vsk149	DDB_G0287363	<i>sibA</i>	Substrate adhesion molecule	0,71
14. Unclassified / Classification uncertain				
x15381	DDB_G0280543	<i>lmcA</i>	Vegetative-specific gene repressed at the onset of development.	3,13
vsh356	DDB_G0280533	<i>lmcB</i>	Vegetative-specific gene repressed at the onset of development.	2,72
sld788	DDB_G0270864		AAA ATPase domain-containing protein (involved in O-glycosylation).	1,64
sse733	DDB_G0277355		Unknown	1,57
sle460	DDB_G0285435		Unknown RNA binding (IEA), ribonuclease activity (IEA)	1,50
slc248	DDB_G0275017		Putative histone acetyltransferase (chromatin assembly or disassembly)	1,48
sle572	DDB_G0289393	<i>psiH</i>	psi = similar to PreSpore Inducing factor psiA	1,41
sla658	DDB_G0284223		Putative metallophosphoesterase	1,38

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
slb891	DDB_G0289719		SFRS2-interacting protein	1,37
ssm263	DDB_G0281609		310 aa extracellular space protein	1,35
sld275	DDB_G0283095	<i>DD3-3</i>	Unknown; involved in O-glycosylation	1,33
ssg355	DDB_G0278667		180 aa unknown protein	1,33
sse696	DDB_G0289013	<i>slc44a2</i>	Solute carrier family 44 protein member 2	1,31
ssb381	DDB_G0271510		Unknown	1,31
slb771	DDB_G0285761		Growth factor receptor domain-containing protein	1,31
sli159	DDB_G0279751		Unknown. Kinase and transferase activity	1,31
ssj217	DDB_G0270330		Unknown. Enriched in gametes	0,37
vsj869	DDB_G0282559	<i>dduA</i>	Downregulated in DupA mutant. Hydrolase activity	0,51
ssk833	DDB_G0288091		Conserved hypothetical 277 aa <i>Dictyostelium</i> protein	0,52
vsj569	DDB_G0279921	<i>gp130</i>	Glycoprotein 130. Involved in pinocytosis	0,52
ssm708	DDB_G0278699		Contains a weak tweety domain of unknown function	0,63
vsj192	DDB_G0281403	<i>nacA</i>	Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit	0,63
vsj673	DDB_G0267458	<i>aac</i>	AAC-rich mRNA	0,64
vsj373	DDB_G0270922		Unknown, multicellular organismal development involved	0,66
ssb448	DDB_G0268948		Putative SAM dependent methyltransferase	0,68
vsc333	DDB_G0273451		AAA+ ATPase, core domain-containing protein	0,68
vsg627	DDB_G0271264	<i>usp14</i>	Ubiquitin Specific Peptidase 14	0,70
ssm472	DDB_G0270584		Unknown	0,71
vsa881	DDB_G0284115		Unknown	0,72
vsg469	DDB_G0281795	<i>nacB</i>	NAC domain-containing protein	0,72
vsg450	DDB_G0275885		MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	0,73
vsb633	DDB_G0275911		Unknown	0,73
y17042	DDB_G0278725	<i>p17</i>	Contains a predicted signal peptide	0,74
vse519	DDB_G0273171	<i>irlF-2</i>	IRE family protein kinase	0,74
ssk436	DDB_G0284999		Conserved hypothetical 277 aa <i>Dictyostelium</i> protein	0,75
vsf302	DDB_G0283007		Unknown	0,76
ssk673	DDB_G0271110		Small Dicty protein family; absent from other organisms	0,77

Tabla 7. Genes diferencialmente regulados en *padA*, en HL5, ordenados según categorías funcionales del *yeast ontology*. De los 76 genes diferencialmente regulados en HL5 se marcan en rojo aquellos genes regulados a la baja y en verde los regulados al alza, junto con las veces de inducción respecto a AX2. Se han resaltado en amarillo los genes comunes a las dos condiciones experimentales.

Tabla 8. Genes diferencialmente regulados en MM ordenados según categorías del *yeast ontology*.

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
1. Metabolism				
1.1 Amino-acid metabolism				
slc675	DDB_G0288907	<i>smt1</i>	Sterol MethylTransferase	1,48
slg564	DDB_G0280961	<i>dhkA</i>	HisK family protein kinase	1,36
slj806	DDB_G0283919		Protein phosphatase 2C-related protein	1,34
slh555	DDB_G0269142	<i>hmgA</i>	Hydroxymethylglutaryl CoA reductase	1,32
ssj717	DDB_G0280637		Unknown	1,30
ssf705	DDB_G0275693		Peptidase C53 family protein	0,56
ssa754	DDB_G0281551	<i>guaA</i>	GMP synthetase	0,64
sli892	DDB_G0277087	<i>purH</i>	Inosine monophosphate cyclohydrolase	0,66
slk745	DDB_G0281071	<i>serA</i>	3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,68
sse878	DDB_G0277725	<i>thfA</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD ⁺)	0,70
ssa106	DDB_G0277947	<i>shmt1</i>	Serine hydroxymethyltransferase	0,71
ssh344	DDB_G0267380	<i>argE</i>	Acetylornithine deacetylase	0,72
sli845	DDB_G0289047		AAA ATPase domain-containing protein	0,75
1.3 Nucleotide metabolism				
ssl394	DDB_G0280267	<i>allC</i>	Allantoate amidohydrolase	1,35
vsh695	DDB_G0277863	<i>pdiA</i>	cAMP phosphodiesterase inhibitor	0,46
ssk605	DDB_G0283987	<i>purC/E</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	0,56
vsb387	DDB_G0273411		Elongation factor P-like protein (Automated)	0,67
ssg701	DDB_G0290121	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-glycine ligase	0,72
1.5 C-compound and carbohydrate metabolism				
sla308	DDB_G0276341	<i>pccB</i>	Propionyl-CoA carboxylase	1,61
slc113	DDB_G0293138	<i>SRC</i>	Related to a gene which is called <i>src1</i> in budding yeast	1,35
slj833	DDB_G0292206	<i>manA</i>	Alpha-mannosidase	0,68
ssd316	DDB_G0269144	<i>hspB</i>	Heat shock cognate protein Hsc70-1	0,75
1.6 Lipid, fatty-acid and isoprenoid metabolism				
ssl437	DDB_G0287717	<i>iliD</i>	Putative phytanoyl-CoA dioxygenase	1,36
vsh849	DDB_G0268064		Esterase/lipase/thioesterase domain-containing protein	0,70
vsg866	DDB_G0278607	<i>mvd</i>	Mevalonate 5-diphosphate decarboxylase	0,73
vsk246	DDB_G0286561	<i>aplC</i>	Amoebapore-like protein C	0,77
3. Transcription				
3.3 mRNA synthesis				
sld776	DDB_G0267714	<i>sf3b4</i>	Subunit of splicing factor SF3B required for spliceosome assembly	1,40
sld642	DDB_G0287243		mRNA-decapping enzyme 1B (Automated)	1,36
3.4 RNA transport				
ssd361	DDB_G0272666		Putative ankyrin repeat protein	1,54

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
3.5 Other transcription activities				
sle767	DDB_G0269932	<i>uap56</i>	ATP-dependent RNA helicase	1,86
slc704	DDB_G0293478		≈Similar to cudA;contains motifs for DNA binding: LSS and RCVSK	1,61
x81824	DDB_G0277857	<i>helB2</i>	Putative RNA helicase	1,50
slh731	DDB_G0291670		Similarity to the human splicing coactivator subunit SRm300	1,46
vsg594	DDB_G0286843	<i>gtaQ</i>	Putative GATA-binding transcription factor	1,38
ssk802	DDB_G0290377	<i>agnB</i>	Argonaut-like protein	1,37
sl323	DDB_G0278077	<i>crtf</i>	CAR1 Transcription Factor	1,35
slf293	DDB_G0268638	<i>dstB</i>	Signal transducer and activator of transcription (STAT) family protein	1,34
slh891	DDB_G0289319	<i>mybQ</i>	myb domain-containing protein	1,32
slb394	DDB_G0292022	<i>ubr7</i>	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7	1,30
4. Translation				
4.1 Ribosomal proteins				
vsd278	DDB_G0272308	<i>rps29</i>	40S ribosomal protein S29	0,77
5. Protein destination				
5.1 Protein folding and stabilization				
vse478	DDB_G0293956		tRNA-binding protein ygjH (Automated)	0,74
5.2 Protein targeting, sorting and translocation				
ssk388	DDB_G0277849	<i>dymA</i>	Dynamin like protein	1,33
5.5 Proteolysis				
ssa716	DDB_G0293388		ATP-dependent metalloprotease	1,37
ssm776	DDB_G0271666	<i>prtB</i>	Proteosomal alpha-subunit 7-1. cAMP responsive gene	0,54
l36205	DDB_G0272815	<i>cprE</i>	Cysteine proteinase 5	0,74
6. Cellular biogenesis and organization				
6.1 Cell wall and plasma membrane				
ssm857	DDB_G0267846	<i>expl1</i>	Expansin-like protein	1,46
6.4 Intracellular transport vesicles				
af014049	DDB_G0289485	<i>vacA</i>	Vacuolin A	1,33
6.5 Nucleus				
slc248	DDB_G0275017		Putative histone acetyltransferase (chromatin assembly or disassembly)	1,40
7. Transport facilitation				
7.9 Other				
slb464	DDB_G0267428	<i>abcH2</i>	Consists of one ABC domain and lacks a transmembrane domain	1,37
9. Movement				
9.1 Cytoskeletal components				
ssc105	DDB_G0285767		Unknown	1,34
slf402	DDB_G0271058	<i>vilC</i>	Villin	1,78
9.2 Cytoskeletal organization				

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
ssb236	DDB_G0287855	<i>pirA</i>	Component of SCAR regulatory complex	1,35
10. Stress response and cell rescue				
10.2 Stress response				
sld643	DDB_G0291568	<i>dnaja1</i>	DnaJ homolog. Conserved molecular chaperone	0,69
vse408	DDB_G0277491	<i>hspG12</i>	Heat shock protein Hsp20 domain-containing protein	0,75
vsa856	DDB_G0277119	<i>hspG8</i>	Heat shock protein Hsp20 domain-containing protein	0,75
11. Signal transduction				
11.3 G-proteins				
sse479	DDB_G0283349	<i>gpaA</i>	G protein alpha subunit Galpha1	1,34
11.4 Regulation of G-protein activity				
vsi382	DDB_G0271980	<i>rabR</i>	Rab GTPase	1,56
sli818	DDB_G0286773	<i>gflB</i>	RasGEF domain-containing protein	1,34
sld259	DDB_G0267568	<i>gacO</i>	RhoGAP domain-containing protein	1,32
ssj429	DDB_G0290829	<i>rabM</i>	Rab GTPase	0,76
11.5 Key kinases				
ab029922	DDB_G0289391	<i>pkiA</i>	Putative protein kinase C inhibitor	0,74
12. Multicellular organization				
12.1 Cell interaction				
af193857	DDB_G0289157	<i>cmfB</i>	Putative receptor mediating cell-density sensing	1,38
j01284	DDB_G0273065	<i>dscC-1</i>	Discoidin <i>gamma</i> subunit	1,37
slb536	DDB_G0278181		Putative GTPase activating protein (GAP)	1,37
u49650	DDB_G0285793	<i>cadA</i>		0,55
m27588	DDB_G0272833	<i>csbA</i>	Contact site B protein	0,68
12.2 Cytodifferentiation				
slb625	DDB_G0287925	<i>DG1037</i>	Developmental gene,ubiquitin domain-containing protein	1,40
sla687	DDB_G0286499	<i>pspG</i>	Prespore protein	1,36
sla257	DDB_G0267394	<i>vps46</i>	Vacuolar Protein Sorting	1,36
12.3 Morphogenesis				
slc619	DDB_G0292214		Similar to <i>tipA</i> (protein phosphatase 2C-related protein)	1,34
Classification uncertain				
vsh356	DDB_G0280533	<i>ImcB</i>	Vegetative-specific gene repressed at the onset of development	3,49
x15380	DDB_G0280543	<i>ImcA</i>	Vegetative-specific gene repressed at the onset of development	3,49
sld788	DDB_G0270864		AAA ATPase domain-containing protein (involved in O-glycosylation).	2,83
ssj693	DDB_G0289467	<i>DD8-14</i>		2,24
slg237	DDB_G0279317		Putative splice factor, identified in the spliceosome C complex	2,15
z37981	DDB_G0283391	<i>kinX</i>	Tyrosine kinase-like protein	1,86
vsj758	DDB_G0276361			1,82

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
ssk687	DDB_G0291646		Unknown	1,65
vsb701	DDB_G0284549	<i>dduF</i>	Contains a predicted signal peptide	1,63
sla395	DDB_G0269048		Unknown	1,63
vsh732	DDB_G0267528		Phagocytic vesicle localized protein	1,55
vsf858	DDB_G0280393		CCHC-type zinc finger-containing protein	1,53
slb781	DDB_G0268576		Unknown	1,53
sld269	DDB_G0268764		Membrane protein	1,51
sse701	DDB_G0274995		Nucleotide binding protein	1,47
sld388	DDB_G0293924		RNA binding protein	1,47
slb891	DDB_G0289719		SFRS2-interacting protein	1,46
vsg586	DDB_G0287575		Unknown	1,46
vsk184	DDB_G0275475		Unknown	1,43
ssk458	DDB_G0275299	<i>cln5</i>	Ortholog of Cln5, implicated in ceroid lipofuscinoses neurodegeneration	1,42
vsj853	DDB_G0291856	<i>gerD</i>	Germination protein (270G)	1,42
slb802	DDB_G0268334		Probable 26S protease subunit YTA6	1,40
sld149	DDB_G0280209		Similar to RNA polymerase II associated proteins	1,40
sld116	DDB_G0272184		Zinc-containing alcohol dehydrogenase (ADH)	1,40
ssl551	DDB_G0287097		FNIP repeat-containing protein	1,40
slb613	DDB_G0269430		Sel1-like protein	1,40
ssc558	DDB_G0284025		Unknown	1,39
slf579	DDB_G0284727		WD repeat-containing protein 37	1,39
slf241	DDB_G0269842		C2H2-type zinc finger-containing protein	1,39
ssm614	DDB_G0285615	<i>iliA</i>	Induced after Legionella Infection.Regulated by <i>gskA</i> and <i>zaka</i>	1,39
vsk295	DDB_G0292892		Unknown	1,38
vsj310	DDB_G0292530		Tetratricopeptide repeat-containing protein	1,38
ssl320	DDB_G0277389		Unknown	1,37
slj251	DDB_G0284289		Unknown	1,37
vsf777	DDB_G0281521		Member of the bromo-AAA+ATPase (BRAT) class of chromatin assembly proteins	1,37
vsf494	DDB_G0291768		Transport protein	1,37
ssa744	DDB_G0281803		SAP DNA-binding domain-containing protein	1,37
sle775	DDB_G0291796		Unknown	1,36
ssd484	DDB_G0283429		Predicted nucleotide-binding protein containing TIR -like domain	1,36
slf512	DDB_G0274487		Protein PNS1 (Automated)	1,36
sld865	DDB_G0281279		Protein LSM14 homolog B (Automated)	1,36
slk791	DDB_G0286797	<i>tsg101</i>	Tumor susceptibility gene 101 protein	1,35
slh292	DDB_G0283675		Unknown	1,35
slc377	DDB_G0268052		Unknown	1,35
slg627	DDB_G0270634		RNA recognition motif-containing protein RRM	1,34
ssl372	DDB_G0286795		Unknown	1,34

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
ssm789	DDB_G0291255	29C	Similar to DDB_G0278725; contains a predicted signal peptide	1,34
ssk843	DDB_G0278271		Ran-binding protein 3 (Automated)	1,34
slh502	DDB_G0289423		SPX/EXS domain-containing protein 4	1,34
vsk291	DDB_G0271488	<i>vta1</i>	VpsTwenty Associated; involved in endosomal protein sorting	1,34
vsh770	DDB_G0293856		Lipid metabolic process	1,34
slk627	DDB_G0267796		Putative RNA splicing factor	1,34
sle583	DDB_G0280177		Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 (Automated)	1,33
slj806	DDB_G0283919		Protein phosphatase 2C-related protein	1,33
ssb389	DDB_G0283523		Unknown	1,33
slh106	DDB_G0286645	<i>cstf3</i>	Cleavage stimulation factor subunit 3	1,33
ssm461	DDB_G0288051		Unknown	1,33
slf515	DDB_G0272262		Unknown	1,33
sla493	DDB_G0282409		Bromodomain-containing protein	1,32
ssc542	DDB_G0294376	<i>fcpA</i>	Putative CTD phosphatase	1,32
sli462	DDB_G0285019		Unknown	1,32
ssf147	DDB_G0283973		Unknown	1,32
slf582	DDB_G0283313		RmlC-like cupin family protein	1,32
ssd121	DDB_G0293748		Unknown	1,31
vsa771	DDB_G0277329		Ubiquitin domain-containing protein	1,31
sle870	DDB_G0286365		Unknown	1,31
slh506	DDB_G0268158		PHD zinc finger-containing protein	1,31
slb178	DDB_G0291788	<i>adprt3</i>	NAD+ ADP-ribosyltransferase	1,31
sli227	DDB_G0269580		Unknown	1,31
ssj217	DDB_G0270330		Unknown. Enriched in gametes	0,48
vsj569	DDB_G0279921	<i>gp130</i>	Glycoprotein 130. Involved in pinocytosis	0,53
vsj373	DDB_G0270922		Unknown, multicellular organismal development involved	0,57
vsj869	DDB_G0282559	<i>dduA</i>	Metallophosphoesterase domain-containing protein	0,57
u55379	DDB_G0267456	<i>cbp2</i>	Calcium-binding protein	0,59
sld432	DDB_G0279985		Putative transmembrane protein	0,62
sli627	DDB_G0272554		DIRS1 ORF2 fragment: retrotransposable element	0,63
vsh773	DDB_G0270420		Sucraseferredoxin-like family protein	0,64
ssd360	DDB_G0268042		CS domain-containing protein	0,67
af133212	DDB_G0274573		Putative transmembrane protein	0,67
ssl389	DDB_G0274459		Conserved hypothetical <i>Dictyostelium</i> protein	0,67
ssc669	DDB_G0293014		Peptidase S28 family protein	0,67
ssb249	DDB_G0277429		Regulator of chromosome condensation domain-containing protein	0,69
ssm731	DDB_G0273105		Stearoyl-CoA9-Desaturase (cytochrome b5 domain-containing protein)	0,71
ssm642	DDB_G0283871		Expressed in pstO cells	0,71

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold
vse661	DDB_G0269566		Unknown. Similar to <i>D. purpureum</i> protein	0,72
af157836	DDB_G0269186	<i>snpC</i>	Soluble NSF attachment protein gamma isoform	0,73
ssc321	DDB_G0289439		Putative protein kinase C inhibitor	0,74
vsh340	DDB_G0267908		Unknown oxidoreductase activity (IEA)	0,74
vsg312	DDB_G0287277		NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	0,74
vsj309	DDB_G0279285		UBX domain-containing protein	0,75
slf379	DDB_G0277729		Unknown. Similar to <i>cfaA</i>	0,76
vsh711	DDB_G0290603		Unknown	0,76
vsa892	DDB_G0278115		DUF829 family protein; contains 1 putative transmembrane domain	0,77
slf105	DDB_G0268210		Unknown. conserved in <i>Dictyostelium</i> and <i>Polysphondylium</i>	0,77
vsf703	DDB_G0270262		Unknown	0,77
ssf309	DDB_G0278725	<i>p17</i>	Similar to DDB_G0278725; contains a predicted signal peptide	0,77

Tabla 8. Genes diferencialmente regulados en *padA*, en MM, ordenados según categorías funcionales del *yeast ontology*. De los 166 diferencialmente regulados en MM se marcan en rojo aquellos genes regulados a la baja y en verde los regulados al alza, junto con las veces de inducción respecto a AX2. Se han resaltado en amarillo los genes comunes a las dos condiciones experimentales.

4.2.3.4 Genes comunes regulados en HL5 y MM

En la Figura 27 se muestra el número total de genes regulados, tanto al alza como a la baja, en HL5 (76) y MM (176). En la intersección de ambos globos se sitúan los 20 genes comunes a las dos condiciones de crecimiento, que están marcados en amarillo en el listado de la Tabla 7 y 8, y están desglosados en la Tabla 9. Entre ellos destacan genes del metabolismo, un 35% del total (marcados en amarillo), todos regulados a la baja en ambas condiciones de cultivo. Incluye genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de purinas (carboxilasa, hidrolasa y ligasa); *argE*, que es una hidrolasa implicada en el ciclo de la urea y el metabolismo de grupos amino, y *mvd*, que es una carboxilasa implicada en el metabolismo de isoprenoides. Es interesante destacar *manA*, (α -manosidasa), una enzima lisosomal que es un marcador de la transición GDT (Schatzle *et al.*, 1991) y *cadA* (en rojo), proteína implicada en adhesión celular y otras funciones durante el desarrollo, de la que ya se ha comprobado su expresión a la baja (Fig. 43).

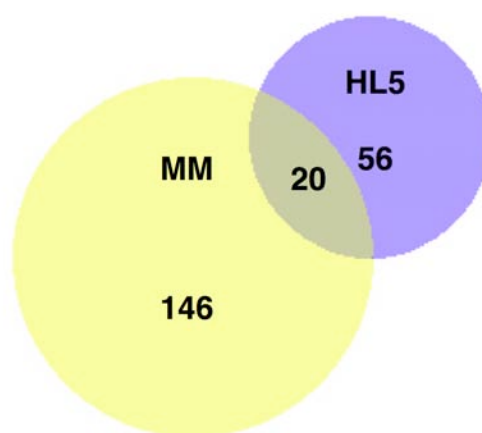


Figura 27. Diagrama de Venn donde se muestra el número de genes diferencialmente regulados en *padA*⁻ en ambas condiciones experimentales. Amarillo: MM. Azul: HL5. En ambos casos los números se refieren al número total, tanto al alza como a la baja. En la intersección el número de genes regulados en las dos condiciones de crecimiento.

Es importante señalar que el número de genes que se modifican en *padA*⁻ en ambas condiciones no es muy elevado y las diferencias de expresión son sutiles, lo que unido a que un elevado porcentaje de genes no se han podido clasificar, permite únicamente poner de manifiesto la estrecha relación de la función de PadA con el metabolismo, en general, y con el de aminoácidos y compuestos nitrogenados, en concreto. También se han detectado 8 genes que están implicados en la transición GDT (crecimiento-desarrollo) (Tabla 10). Algunos, como *manA* o *cadA*, están regulados a la baja en ambas condiciones de crecimiento; otros, como *grp24* o *pdiA*, lo están en HL5, y *gpaA*, *crtf*, *cmfB* y *dscC-1* están regulados al alza en MM. Otra de las rutas representada entre los genes regulados es la glucolisis y la ruta de las pentosas fosfato, con *pfkA* (6- fosfofructoquinasa) y *g6pd* (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) regulados a la baja en HL5, además de *amyA* (α -amilasa) implicada en la biosíntesis de trehalosa y regulada al alza también en HL5.

Al observar la presencia de proteínas de comunicación intercelular como *cadA* o *tgrC* entre las reguladas, y que el proteoma extracelular se había publicado recientemente (Bakthavatsalam y Gomer, 2010), se comparó la lista de los genes regulados con la de los genes del proteoma secretado. No se obtuvo un enriquecimiento significativo, ya que sólo el 7,9% en el caso de HL5 y el 5,6% en MM se correspondían a proteínas destinadas al medio extracelular.

Tabla 9. Genes regulados en *padA*⁻ comunes a las dos condiciones experimentales: HL5 y MM.

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold	
				HL5	MM
sli892	DDB_G0277087	<i>purH</i>	Inosine monophosphate cyclohydrolase	0,66	0,66
ssk605	DDB_G0283987	<i>purC/E</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	0,62	0,56
ssg701	DDB_G0290121	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-glycine ligase	0,71	0,72
m82822	DDB_G0292206	<i>manA</i>	Alpha-mannosidase.	0,72	0,68
vsh849	DDB_G0268064		Esterase/lipase/thioesterase domain-containing protein	0,72	0,70
vsg866	DDB_G0278607	<i>mvd</i>	Mevalonate 5-diphosphate Decarboxylase	0,62	0,73
slc458	DDB_G0267380	<i>argE</i>	Acetylornithine deacetylase	0,74	0,72
ssj287	DDB_G0285793	<i>cadA</i>	Calcium-dependent cell adhesion molecule-1	0,49	0,55
sle413	DDB_G0291568	<i>dnaja1</i>	DnaJ homolog subfamily A member 1 conserved molecular chaperone	1,41	0,69
ssm857	DDB_G0267846	<i>expl1</i>	Expansin-like protein	1,58	1,46
x15381	DDB_G0280543	<i>lmcA</i>	Vegetative-specific gene repressed at the onset of development.	3,13	3,49
vsh356	DDB_G0280533	<i>lmcB</i>	Vegetative-specific gene repressed at the onset of development.	2,72	3,49
sld788	DDB_G0270864		AAA ATPase domain-containing protein (involved in O-glycosylation).	1,64	2,83
slc248	DDB_G0275017		Putative histone acetyltransferase (chromatin assembly or disassembly)	1,48	1,40
slb891	DDB_G0289719		SFRS2-interacting protein (Automated)	1,37	1,46
ssj217	DDB_G0270330		Unknown. Enriched in gametes	0,37	0,48
vsj869	DDB_G0282559	<i>dduA</i>	Downregulated in DU _P A mutant.	0,51	0,57
vsj569	DDB_G0279921	<i>gp130</i>	Glycoprotein 130. Involved in pinocytosis	0,52	0,53
vsj373	DDB_G0270922		Unknown, multicellular organismal development involved	0,66	0,57
y17042	DDB_G0278725	<i>p17</i>	Contains a predicted signal peptide	0,74	0,77

Tabla 9. Genes diferencialmente regulados en *padA*⁻ comunes a las dos condiciones experimentales: HL5 y MM. En amarillo, los genes de metabolismo, en rojo, *cadA*, proteína de adhesión, también implicada en diferenciación y desarrollo. En naranja, *dnaja1*, proteína chaperona y en azul, genes sin caracterizar. *lmcA* y *lmcB* son ubicuos y se considera un resultado no específico en la mayoría de estudios por micromatrices de *D. discoideum*.

Tabla 10. Genes diferencialmente regulados en *padA*⁻ implicados en el GDT

EST/ Category	DDB_GO ID	Gene name	Description	Fold	Conditio n
m82822	DDB_G0292206	<i>manA</i>	Alpha-mannosidase.	0,72	HL5 +MM
sla176	DDB_G0280057	<i>grp94</i>	Glucose-Regulated Protein 94 Hsp90 family	0,66	HL5
ssj287	DDB_G0285793	<i>cadA</i>	Calcium-dependent cell adhesion molecule-1	0,49	HL5 +MM
vsh695	DDB_G0277863	<i>pdiA</i>	cAMP phosphodiesterase inhibitor	0,46	MM
sse479	DDB_G0283349	<i>gpaA</i>	G protein alpha subunit 1	1,34	MM
sli323	DDB_G0278077	<i>crtf</i>	CAR1 Transcription Factor	1,35	MM
af193857	DDB_G0289157	<i>cmfB</i>	Putve.receptor mediating cell-density sensing	1,38	MM
j01284	DDB_G0273065	<i>dscC-1</i>	Discoidin gamma subunit	1,37	MM

Tabla 10. Genes regulados en *padA*⁻ que están implicados en el GDT. *cadA* y *manA*, en amarillo, son marcadores del GDT que están diferencialmente regulados en ambas condiciones experimentales (HL5 y MM). El resto, genes regulados en la condición indicada en la última columna.

4.2.4 PadA y la regulación del metabolismo de los azúcares

Hay evidencias de la relación entre la glucosa y otros azúcares en la regulación del crecimiento y el tamaño del organismo en *Dictyostelium discoideum* (Garrod y Ashworth, 1972; Rickenberg *et al.*, 1975; Jang *et al.*, 2002; Jang y Gomer, 2005). El mutante *padA*⁻ forma agregados de pequeño tamaño, que se analizarán en el siguiente apartado, y crece peor que el tipo silvestre, por lo que se examinaron los genes implicados tanto en la regulación del tamaño como en el metabolismo de azúcares que aparecían alterados en las micromatrices.

4.2.4.1 La adición de azúcares al medio mínimo no complementa el defecto en crecimiento de *padA*⁻

El análisis por micromatrices reveló una serie de genes implicados en el metabolismo de la glucosa y otros azúcares, como *pfk*, (fosfofructokinasa), *g6pd* (glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), *amyA* (α -amilasa; implicada en la síntesis de trehalosa), entre otros, la mayoría de ellos regulados a la baja en *padA*⁻. Se planteó si el defecto en crecimiento de *padA*⁻ se podría corregir con la adición de azúcares al medio mínimo. Ya se había descrito que la glucosa, la maltosa o la trehalosa acortan el tiempo de generación de *D. discoideum* (Rickenberg *et al.*, 1975). Añadir 23 g/L de glucosa adicional al medio mínimo (que ya de por sí contiene 10 g/L), o trehalosa, sacarosa o maltosa, no mejoró significativamente el crecimiento de *padA*⁻ (Fig. 28. B, C) (Tresse *et al.*, 2008). Únicamente el aumento de la

concentración de glucosa permitió un ligero incremento de la velocidad de crecimiento (Fig. 28. A).

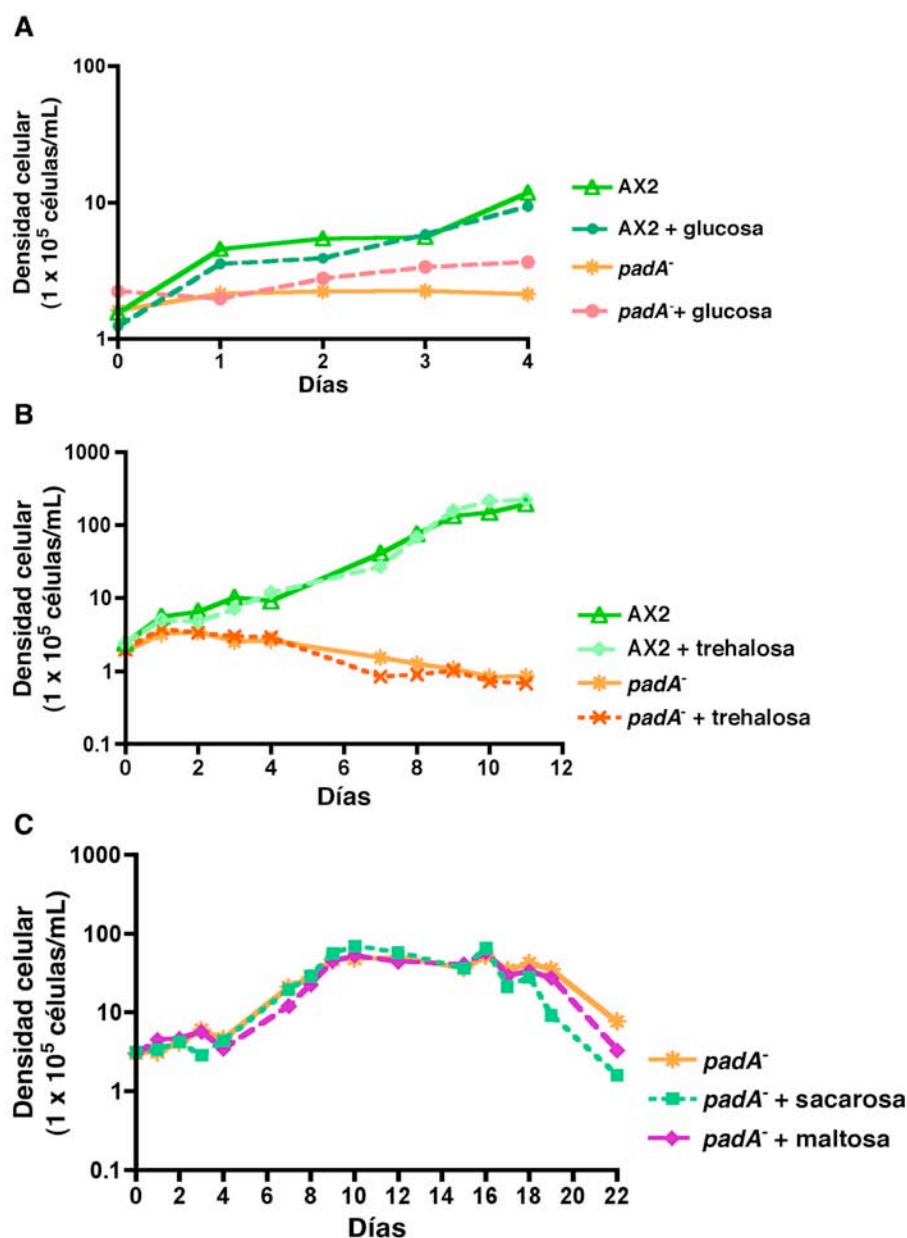


Figura 28. Curvas de crecimiento de AX2 y *padA*⁻ en medio mínimo (+NH₄Cl) suplementado con diferentes azúcares. Glucosa (A), trehalosa (B), maltosa y sacarosa (C). Las células habían crecido previamente en medio completo HL5 y se transfirieron a MM a una densidad inicial de 2-2,8 x 10⁵ células/mL. La densidad celular se cuantificó cada 24 h con un hemocitómetro. Las gráficas son representativas de, al menos, 3 experimentos independientes.

4.2.4.2 El Counting Factor está ligeramente alterado en *padA*⁻

Otros genes relacionados con el tamaño del territorio están regulados al alza en *padA*⁻, como *cf50*, que codifica un componente del complejo multiproteico *counting factor* (CF), relacionado con los niveles de glucosa intracelular en *D. discoideum* (Jang *et al.*, 2002). Se confirmó por RT-PCR semi-cuantitativa la ligera regulación al alza de *cf-50* (Tabla 7), no sólo durante el crecimiento vegetativo, sino también durante las 11 primeras horas del desarrollo (Fig. 29. A) donde se analizaron los niveles de ARNm.

Este estudio se completó con el análisis de la transcripción de genes que forman parte del CF (*ctnA*) y otros regulados por él, como *glk* (glucoquinasa). Como se observa en la Figura 29. B, que corresponde a la cuantificación del ARNm de *ctnA* entre 0-11 h, *ctnA* presenta niveles de transcrito ligeramente superiores a los del silvestre a las 4 h. CF regula de forma negativa la *glk*, una hexoquinasa de *D. discoideum* con una elevada especificidad de sustrato por la glucosa y prácticamente nula por otras hexosas (Baumann, 1969). Cuando se analizó su patrón de expresión durante 0-11 h por RT-PCR semi-cuantitativa, se observó que la cantidad de mRNA de *glk* en *padA*⁻ es inferior durante el inicio del desarrollo (Fig 29. C), lo que concuerda con la regulación al alza de los dos componentes del CF analizados, *ctnA* y *cf-50*.

No se han descrito proteínas reguladoras del CF, salvo IfkA; una eIF2 α -quinasa, que regula la traducción de Countin (Fang *et al.*, 2003). Su expresión durante el desarrollo temprano, como se observa en la Figura 29. D, está ligeramente aumentada en *padA*⁻ a las 10-11 h.

4.2.5 La transición crecimiento-desarrollo (GDT) está alterada en el mutante *padA*⁻

La transición GDT es el punto de inflexión entre la vida unicelular y la multicelular en el ciclo de vida de *D. discoideum*. El GDT está finamente regulado por factores autocrinos que monitorizan la densidad celular en relación a la disponibilidad de nutrientes, y de forma regulada inducen la síntesis de los genes esenciales para la entrada en el desarrollo, entre los que destacan los genes del relé de AMPc.

En el análisis transcripcional por micromatrices (apartado 4. 2. 3), se detectaron varios genes regulados en *padA*⁻ que están implicados en el GDT (Tabla 8). Cuatro de ellos (*gpaA*, *crtf*, *cmfB* y *dscC*) están regulados al alza en medio mínimo, que, como ya se ha mencionado, reproduce en cierta medida la situación previa a la entrada en desarrollo. *pdiA* está regulado a la baja en MM y *cadA* y *manA* también están modificados a la baja en ambas condiciones (HL5 y MM), mientras *grp94* está regulado al alza en HL5.

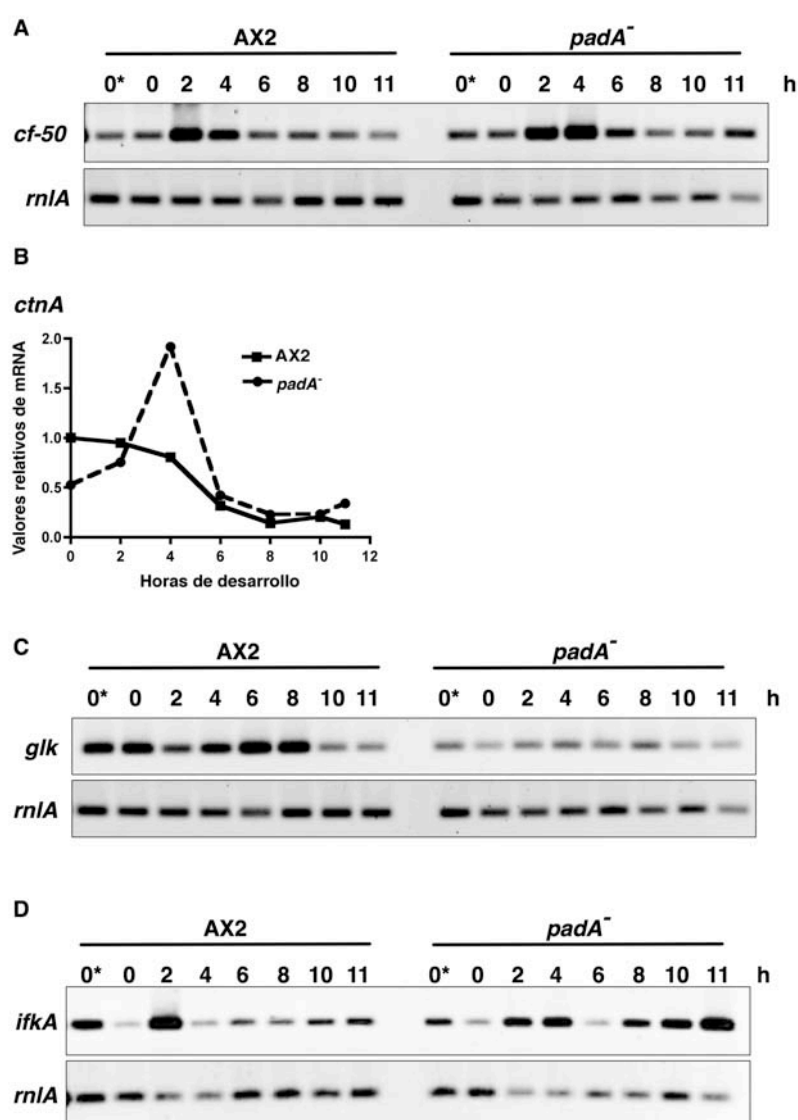


Figura 29. Los componentes del CF están ligeramente desregulados en *padA*⁻. **A)** RT-PCR semi-cuantitativa de *cf-50* durante las primeras 11 h del desarrollo (en condiciones de ayuno) y de células en crecimiento vegetativo: 0*. **B)** Cuantificación del ARNm de *ctnA* en AX2 y *padA*⁻ (0-11 h) por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. **C)** y **D)** RT-PCR semi-cuantitativa de *glk* e *ifkA* al inicio del desarrollo y de células en crecimiento vegetativo: 0*. En todos los casos se empleó el gen *rnlA* como control de carga. Se muestra un experimento representativo.

Estos datos, unidos al fenotipo durante el crecimiento vegetativo del mutante, plantearon la hipótesis de que la regulación transcripcional del GDT en *padA*⁻ esté alterada. Se estudió, por RT-PCR semi-cuantitativa, el perfil de expresión en el desarrollo temprano (0-11 h) de 4 genes claves del GDT: *dscA*, *dia-2*, *pdsA*, *yakA* y *cmfA*, que no figuran en la tabla 8, y que también se expresan durante el desarrollo temprano. El gen que codifica la cadena α de la

discoidina (*dscA*) tiene un pico de expresión ligeramente (≈ 2 h) adelantado respecto al tipo silvestre, al igual que *dia-2*. Además, en ambos casos se aprecia una banda más intensa en el carril correspondiente a 0 h en HL5 (0*), lo que coincide con la expresión regulada al alza de *dscC* (cadena γ de la discoidina) (Tabla 8). Esta regulación al alza en medio HL5 también se observa para el gen *yakA* (Fig. 30), no representado en las micromatrices, y cuya expresión es ligeramente más elevada en tiempo 0 h HL5 y, considerablemente más baja que la de AX2, durante el desarrollo temprano. Esto plantea la posibilidad, que no se exploró por falta de tiempo, de que esta quinasa, a través de PKA y de los factores de transcripción correspondientes, regule la expresión de genes del relé del AMPc (Souza *et al.*, 1998, 1999). Otros genes del GDT, que se encuentran por debajo de *yakA* como *pdsA*, *cadA*, *pdiA* o *carA* están regulados a la baja (Fig. 44) y se analizarán en el capítulo siguiente. *padA*⁻ no presenta niveles de expresión de *cmfA* (CMF) aparentemente muy diferentes a los del tipo silvestre (Fig. 30), aunque *cmfB* (CMFR1), uno de los dos receptores de CMF, está regulado al alza según el análisis de micromatrices (Tabla 8). Ésto puede deberse a un mecanismo compensatorio ante la baja expresión de *pdsA* y *carA*, en el inicio del desarrollo (Fig. 44). Además, la subunidad $G\alpha 1$ (*gpaA*), que regula negativamente la señalización a partir de la activación del complejo CarA-AMPc, también figura entre las reguladas positivamente en MM (Tabla 8), lo que podría alimentar la defectuosa señalización del AMPc que tiene *padA*⁻, que se analizará posteriormente.

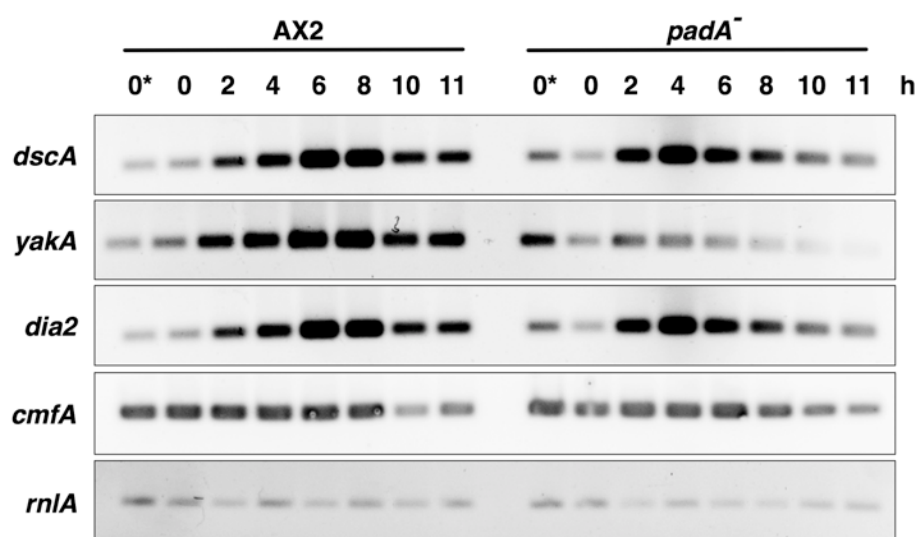


Figura 30. RT-PCR semi-cuantitativa de algunos genes del GDT (growth-development transition). Se empleó ARNm de las primeras 11 h del desarrollo y de células en crecimiento vegetativo: 0*. Se muestra un experimento representativo de cada RT-PCR. El gen *rnlA* se empleó como control de carga.

4.3 DESARROLLO TEMPRANO: AGREGACIÓN

4.3.1 Las células *padA*⁻ forman menos territorios de agregación y de menor tamaño que el tipo silvestre

La agregación es el primer paso hacia la multicelularidad en *Dictyostelium*. Este complejo y regulado proceso puede reproducirse en el laboratorio tanto en soporte sólido como en condiciones sumergidas (apartado 3.8.3. Material y Métodos). Pequeños defectos (ej: movilidad celular) que quedan enmascarados en soporte sólido, salen a la luz en condiciones sumergidas, principalmente por el diferente entorno físico y la diferencia en la velocidad de difusión de los compuestos extracelulares. En las condiciones de agregación sumergida ($1,56 \times 10^5$ cells/cm²), *padA*⁻ forma un número de territorios de agregación 40 veces mayor que el tipo silvestre. Además, el tamaño de los mismos es menor que los que forman las células de AX2, con cadenas de células (*streams*) más cortas. (Fig. 31. A, B). El fenotipo también es evidente sobre un soporte sólido como el agar purificado ($1,56 \times 10^5$ cells/cm²), aunque de manera menos dramática (Fig. 31.C).

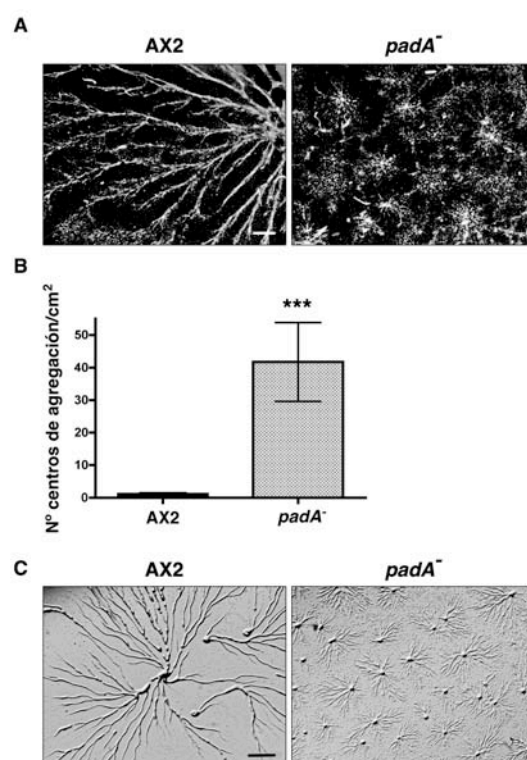


Figura 31. *padA*⁻ forma menos centros de agregación y más pequeños que AX2. A) Células AX2 y *padA*⁻ en desarrollo en condiciones sumergidas ($1,56 \times 10^5$ cells/cm²). Fotos tomadas a las 13 h. **B)** Cuantificación del número de centros de agregación formados por AX2 y *padA*⁻ en condiciones sumergidas (n=14. *** $p \leq 0,0001$). **C)** Fenotipo de agregación sobre sustrato sólido a las 10 h del desarrollo. Barra: 1 mm.

4.3.2 *PadA* es necesaria para establecer el tamaño correcto de los centros de agregación

El desarrollo de *D. discoideum* permite la formación de quimeras donde conviven células de distinto genotipo para dar lugar a un cuerpo fructífero único. El comportamiento de cada población ofrece información muy valiosa sobre los genotipos mutantes. En el caso de quimeras de AX2 y *padA*⁻, a medida que aumenta la proporción de células del tipo silvestre (AX2), el tamaño de los territorios también aumenta, y el número de los centros de agregación disminuye de la misma manera. En condiciones sumergidas, la presencia de un 20% de células AX2 disminuye a la mitad el número de territorios y un 80% da lugar a un fenotipo prácticamente silvestre (Fig. 32. A, B). El mismo resultado se observa sobre sustrato sólido (Fig. 32. C), condición más similar a su hábitat natural, aunque en estas condiciones el rescate es más proporcional al número de células silvestres en la mezcla. A las 24 h de desarrollo, (Fig. 32. D), *padA*⁻ no ha culminado y las quimeras lo hacen proporcionalmente al número de células AX2 presentes.

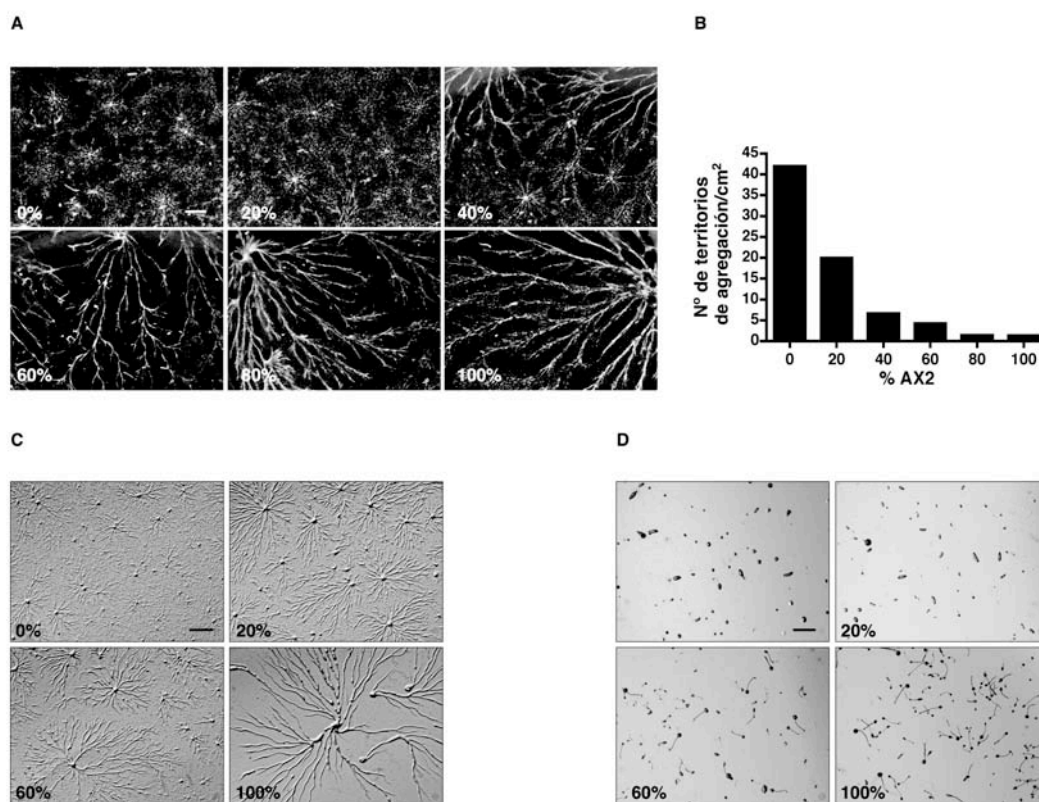


Figura 32. Células *padA*⁻ en quimeras de agregación con cantidades crecientes de células silvestres. A) Agregación en condiciones sumergidas a las 13 h. Se indica el porcentaje de células silvestres incluídas en la mezcla. **B)** Cuantificación representativa del nº de territorios formados con cada porcentaje de AX2 en condiciones sumergidas. **C)** Quimeras de agregación en sustrato sólido a las 9 h y **D)** a las 24 h. Barra: 1 mm.

Estas observaciones nos llevan a afirmar que la proteína PadA es necesaria para el establecimiento del correcto tamaño de los territorios de agregación. También se extrae que el defecto de *padA*⁻ durante la agregación es autónomo celular, ya que el tamaño y número de los territorios se rescata de forma proporcional al número de células silvestres en la mezcla.

4.3.3 Las células *padA*⁻ están homogéneamente distribuidas en los centros de agregación en quimeras con células silvestres

Para determinar si un defecto en movilidad, adhesión o velocidad podría contribuir al defecto del mutante en este periodo del desarrollo, se observó el comportamiento durante la agregación de células *padA*⁻ en quimeras con AX2. En un primer experimento se intentó mezclar células AX2 y *padA*⁻ marcadas con tinciones vitales (*cell tracker*, Molecular Probes) una cepa en verde, la otra en rojo, pero no resultó, ya que la fluorescencia emitida por estos fluoróforos no era lo suficientemente intensa 10-12 h después, cuando se analizaba el resultado. Como alternativa se emplearon las cepas AX2/A15::GFP y *padA*⁻/A15::RFP que se combinaron al 50% (1:1) sobre agar ($2,5 \times 10^5$ cells/cm²). Se tomaron imágenes al inicio de la agregación celular; entre las 9 y 10 h de desarrollo. Como se observa en la Figura 33. B, las células *padA*⁻/A15::RFP (rojas) están presentes en los primeros centros de agregación que se forman, y están igualmente representadas que las células silvestres AX2/A15::GFP (verdes), no se observa diferencia en la distribución de AX2 y *padA*⁻. Este resultado se reproduce en ambos soportes, si bien en condiciones sumergidas el proceso de agregación es ligeramente más lento (Fig. 33. A). Adicionalmente, se tomaron imágenes a las 24 h de las células incubadas en condiciones sumergidas (Fig. 33. C), ya que en estas condiciones se “congela” la agregación, y también se observa la distribución homogénea de *padA*⁻ (rojo).

El conjunto de las observaciones sugiere que las células *padA*⁻ responden correctamente a las señales iniciales de agregación y lo hacen al mismo tiempo que las silvestres. Además, no están ausentes del inicio de la formación de los centros y tampoco de la parte más distal de los *streams*. La velocidad de agregación tampoco parece estar afectada, y a este respecto, anteriormente, se había testado la velocidad de respuesta de *padA*⁻ a un exceso de AMPc emitido por una micropipeta, no observándose cambios respecto al comportamiento de AX2 (I. Serafimidis y T. Suárez, comunicación personal).

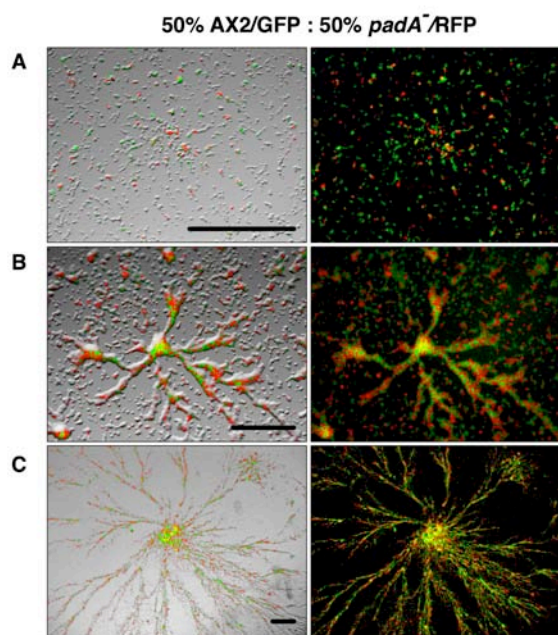


Figura 33. Quimeras de agregación con mezclas 1:1 de células AX2 marcadas en verde (GFP) y *padA*⁻ en rojo (RFP). En condiciones sumergidas a las 9 h (A) y a las 25 h (C). Sobre sustrato sólido a las 9 h (B). Fotografías tomadas en lupa de fluorescencia. Barra: 0,25 mm.

4.3.4 El defecto en agregación de las células *padA*⁻ se rescata con alta densidad celular

En *D. discoideum*, el primer mecanismo de control del tamaño del territorio corresponde a la amplitud de los pulsos de AMPc. Tanto el aumento como la disminución del relé de AMPc tienen efectos dramáticos sobre el tamaño del territorio de agregación y la disminución en el tamaño de los mismos puede producirse tanto por defecto como por exceso de AMPc (Kesbeke y Van Haastert, 1988; Jang y Gomer, 2008; Faure *et al.*, 1988; Adames *et al.*, 1994; Palsson *et al.*, 1997; Thadani *et al.*, 1977). Jang y Gomer demostraron que en *cnrN*⁻, un mutante sobreproductor AMPc que forma territorios muy pequeños, se rescataba el fenotipo al diluir la densidad celular (Jang y Gomer, 2008). Atendiendo a esta evidencia, se realizaron ensayos de agregación en soporte líquido y sólido con concentración celular variable, tanto mayor como menor: $1,56 \times 10^5$ células/cm² (1X la densidad estándar), $7,8 \times 10^4$ células/cm² (0,5X), $3,9 \times 10^4$ células/cm² (0,25X) y $1,95 \times 10^4$ células/cm² (0,125X), $3,12 \times 10^5$ células/cm² (2X) y $6,24 \times 10^5$ células/cm² (4X) y $1,2 \times 10^6$ células/cm² (8X). En AX2, el proceso de agregación se interrumpió en condiciones sumergidas por debajo de $3,9 \times 10^4$ células/cm² (0,25X) y en *padA*⁻, por debajo de $7,8 \times 10^4$ células/cm² (0,5X). Sobre agar ultrapuro, *padA*⁻

consigue agregar hasta una densidad 0,25X ($3,9 \times 10^4$ células/cm²), pero el fenotipo se exagera (no mostrado). *padA*⁻ no revierte su defecto en agregación al diluir las células que entran en agregación, por el contrario, al aumentar la concentración celular 4 veces ($6,24 \times 10^5$ células/cm²), las células *padA*⁻ forman *streams* largos y centros menos numerosos, tanto en condiciones sumergidas (Fig. 34. A superior) como sobre agar ultrapuro (Fig. 34. A inferior). Incluso, se observó, que densidades muy altas como $1,2 \times 10^6$ células/cm² (8X) disminuían el tamaño del territorio de AX2, en comparación con *padA*⁻, que en estas condiciones forma territorios de agregación más grandes (Fig. 34. B).

Se han documentado varios mutantes donde el proceso de la agregación es dependiente de alta densidad celular, como mutantes de la cadena pesada de la miosina (*mhcA*⁻) (Jung y Hammer, 1990) que tienen afectada la quimiotaxis y la motilidad celular, mutantes en proteínas de la transición GDT que controlan la señalización del AMPc, como *dia2*^{AS} (Chae *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 2008), etc. En el caso de *padA*⁻, las evidencias apuntan a que existe una deficiencia en la amplitud del pulso de AMPc, por lo que las células, al encontrarse en mayor número/cm² están físicamente más juntas, a menor distancia la una de la otra, lo que les permite transmitir la onda de AMPc a un número de células más elevado y así formar *streams* más largos. Los resultados sugieren que *padA*⁻ podría ser deficitario en AMPc extracelular.

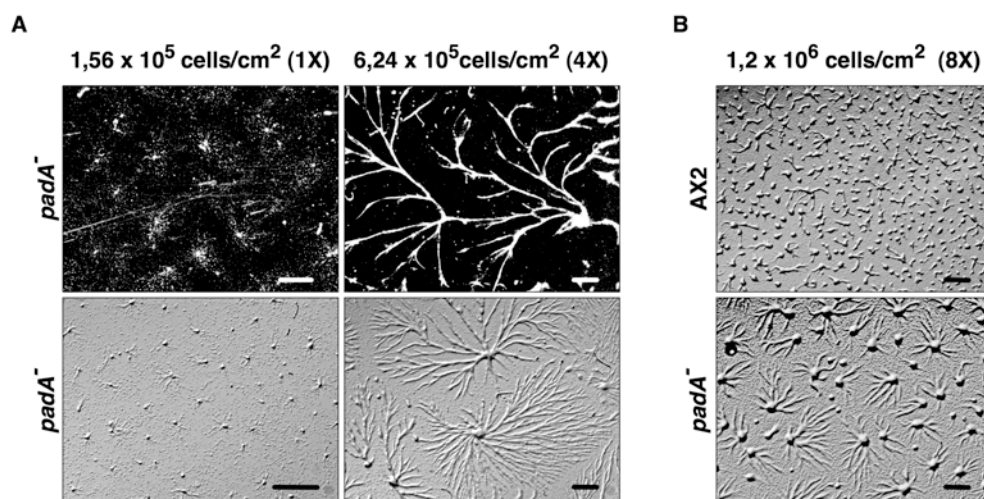


Figura 34. Complementación del tamaño del territorio de *padA*⁻ en alta densidad celular. Células *padA*⁻ se depositaron para su agregación a la densidad estándar (A, 1X) o cuatro veces superior (A, 4X), tanto en condiciones sumergidas (A. superior) como sobre agar ultrapuro (A. inferior). Imágenes tomadas a las 13 h (sumergidas) y 9,5 h (agar). B) Células AX2 y *padA*⁻ depositadas sobre agar ultrapuro a las 10 h, a una densidad 8 veces superior a la estándar. Barra: 1 mm.

4.3.5 La cafeína fenocopia el defecto en agregación de *padA*⁻ en el tipo silvestre

En *D. discoideum*, la cafeína inhibe la activación de la adenilato ciclasa mediada por AMPc de manera rápida y reversible (Brenner *et al.*, 1984). No afecta a la viabilidad celular, disponibilidad de ATP, niveles de GTP, quimiotaxis, síntesis de GMPc o respuesta al AMPc, su efecto es rápidamente reversible y afecta de manera específica a la síntesis de AMPc inducida por AMPc. El efecto de la cafeína es detectable a partir de 50 μ M y, con 150 μ M, la inhibición es del 50% (Brenner *et al.*, 1984). Se depositaron células en ayuno de AX2 y *padA*⁻ sobre una cama de agar con 1 mM cafeína, para analizar el efecto de la anulación de la actividad AcaA. AX2, en presencia de 1 mM cafeína fenocopia el fenotipo en agregación de *padA*⁻, formando centros de agregación más pequeños y más numerosos, que se asemejan a los que forma *padA*⁻ en condiciones normales (Fig. 35). Las células *padA*⁻ con la misma dosis de cafeína tienen dificultades para concluir el proceso de agregación y aunque consiguen hacerlo, con mucho retraso, el defecto se ve exacerbado. También se testaron concentraciones más altas de cafeína, y en ambas cepas y todas las concentraciones, la agregación se aceleraba, para formar *mounds* más numerosos y pequeños que a partir de 2,5 mM no conseguían avanzar en el proceso de desarrollo, en ninguna de las dos cepas (no mostrado). Como control se empleó la cepa *cnrN*, sobreproductora de AMPc (Jang y Gomer, 2008), y aunque el efecto de la cafeína sobre la agregación era muy acusado, este mutante consiguió culminar incluso con 2,5 mM de cafeína, mostrando mayor resistencia a la inhibición de la actividad AcaA (no mostrado). Todos estos datos apoyan un posible déficit de actividad de la AcaA en el mutante *padA*⁻.

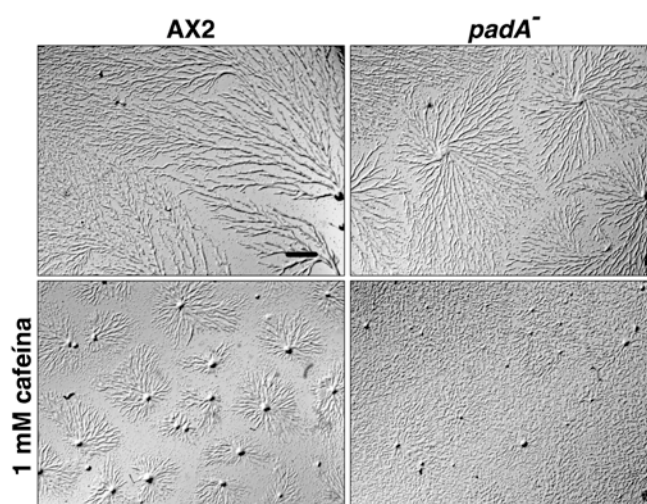


Figura 35. Efecto de la cafeína sobre la agregación de AX2 y *padA*⁻. Agregación sobre agar en ausencia (superior) o presencia de 1 mM cafeína (inferior). Fotos tomadas a las 10 h. Barra: 1 mm.

4.3.6 La adición de AMPc o 8-Bromo-AMPc no rescata el fenotipo de agregación

Los resultados anteriores sugerían que el AMPc podía ser limitante en el proceso de agregación de las células *padA*⁻, de modo que el agar ultrapuro se suplementó con AMPc (5 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM) para observar su efecto sobre la agregación de las células. La concentración de AMPc alcanzada *in vivo* durante la agregación oscila entre 1 nM y 1 μ M, (Tomchik y Devreotes, 1981). Todas las concentraciones testadas retrasan, en ambas cepas, el inicio de la agregación en una hora aproximadamente. A tiempo final, cuando los centros ya se han establecido, se observa que éstos tienden a ser más pequeños a medida que aumenta la concentración de AMPc. Aunque con las concentraciones más bajas (5 nM, 10 nM) apenas es perceptible, con 50 nM y 100 nM es más evidente. En *padA*⁻, con las concentraciones más altas, se observa un mayor número de células que no entran a formar parte de los centros respecto al tipo silvestre (Fig. 36. A) (sólo se muestra el fenotipo con 0, 10 y 100 nM de AMPc). Tampoco la presencia, en condiciones de agregación sumergida, de 8-Bromo-AMPc, un análogo permeable del AMPc y que activa la PKA (Kay, 1989), restauró el defecto en la agregación de *padA*⁻ (no mostrado). Con esto se quería descartar que el defecto residiera en la incorrecta activación de la señalización intracelular del AMPc. También se comprobó si el sobrenadante de células *cnrN*⁻ (sobreproductoras de AMPc) (Jang y Gomer, 2008) incubadas en ayunas durante 7 h en alta densidad, restauraba el tamaño del territorio de *padA*⁻ en condiciones sumergidas. A las 16 h se observa que, a pesar de que el proceso agregativo se acelera, no se observan cambios en el tamaño de los territorios (Fig. 36. B).

Los resultados muestran que el AMPc, añadido de forma discreta y única no revierte el defecto en agregación de las células *padA*⁻.

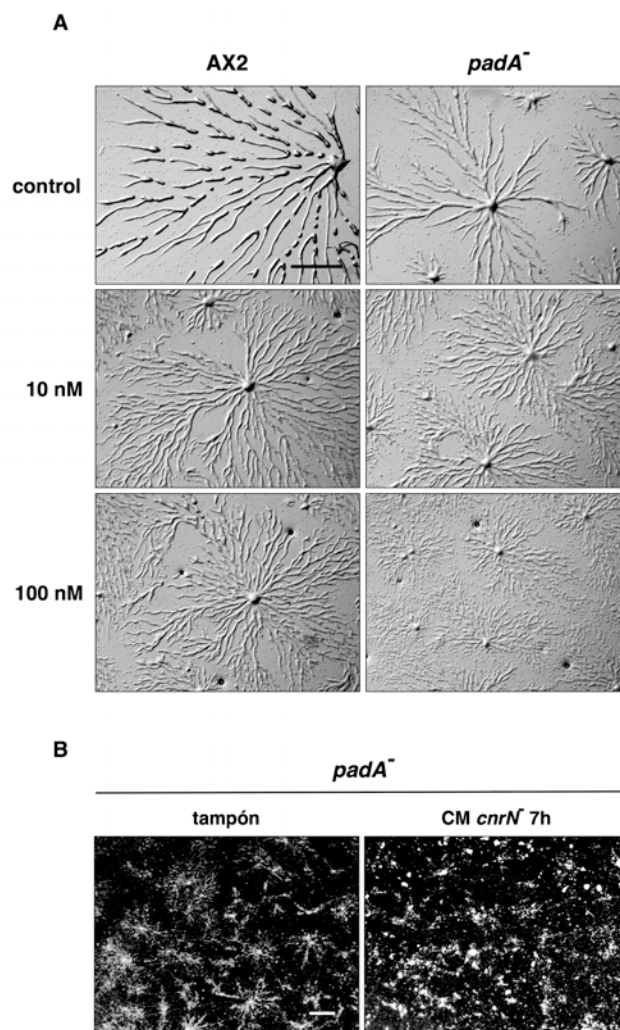


Figura 36. Efecto del AMPc sobre el proceso de agregación de *padA*⁻. **A)** Agregación de AX2 y *padA*⁻ sobre agar con diferente concentración de AMPc. **B)** Células *padA*⁻ en agregación sumergida con tampón o medio condicionado (CM) de 7 h de *cnrN*⁻. Barra: 1 mm.

4.3.7 El medio condicionado de *padA*⁻ impide la correcta agregación en el tipo silvestre

El sobrenadante (caldo o medio condicionado) obtenido de células AX2 que han estado 7 h en ayuno (tiempo donde se expresan de forma máxima los genes *pdsA*, *acaA*, *pdiA*, y *carA*) es capaz de rescatar la agregación cuando se añade a una cepa deficiente en actividad PdsA, que no agrega (Darmon *et al.*, 1978). Se quiso comprobar si algún componente de este caldo revertía el defecto de *padA*⁻ durante la agregación. Para ello se obtuvieron caldos condicionados de AX2 y *padA*⁻ a las 7 y 24 horas del desarrollo. Aunque los caldos se

prepararon también a partir de concentraciones inferiores de células, las conclusiones más importantes se obtuvieron del caldo obtenido a partir de 1×10^7 células/mL (Darmon *et al.*, 1978) porque el efecto era más evidente.

En la Figura 37. A se observa que el medio condicionado de AX2 no restaura el tamaño del territorio de *padA*⁻ en estas condiciones, si bien acelera ligeramente el proceso en *padA*⁻ y también en AX2 (no mostrado), según estaba descrito (Darmon *et al.*, 1978). El caldo condicionado de *padA*⁻ no restaura su propio proceso agregativo y, además, interfiere en la agregación del silvestre desde el principio, impidiendo la formación de centros de agregación funcionales (Fig. 37. A). En la Figura 37. B, donde se muestra la morfología de las células incubadas con los diferentes medios condicionados (CM) a las 7 h del desarrollo, se observa con más detalle cómo el CM de AX2 acelera su propio proceso (Fig. 37. B. “AX2 CM AX2”). Se observan células totalmente polarizadas y en proceso activo de agregación, mientras este caldo sobre *padA*⁻ (Fig. 37. B *padA*⁻ CM AX2), aunque acelera ligeramente la agregación respecto a *padA*⁻ control, no restaura el fenotipo. El efecto “tóxico” del CM de *padA*⁻ sobre AX2 observado en la Figura 37. A, se aprecia mejor en esta figura (Fig. 37.B. AX2 CM *padA*⁻), donde se observan células AX2 redondeadas y refringentes, y se observa que el CM de *padA*⁻ favorece, además, la lisis celular.

Una de las posibles causas de la toxicidad del CM de *padA*⁻ podía ser una excesiva secreción al medio de fosfodiesterasa (PdsA), y para intentar compensarlo se suplementó el CM con 500 pM de AMPc. Sin embargo, el efecto deletéreo del CM de *padA*⁻ no se rescató, ni a nivel de la morfología celular (Fig. 37. C) ni de agregación.

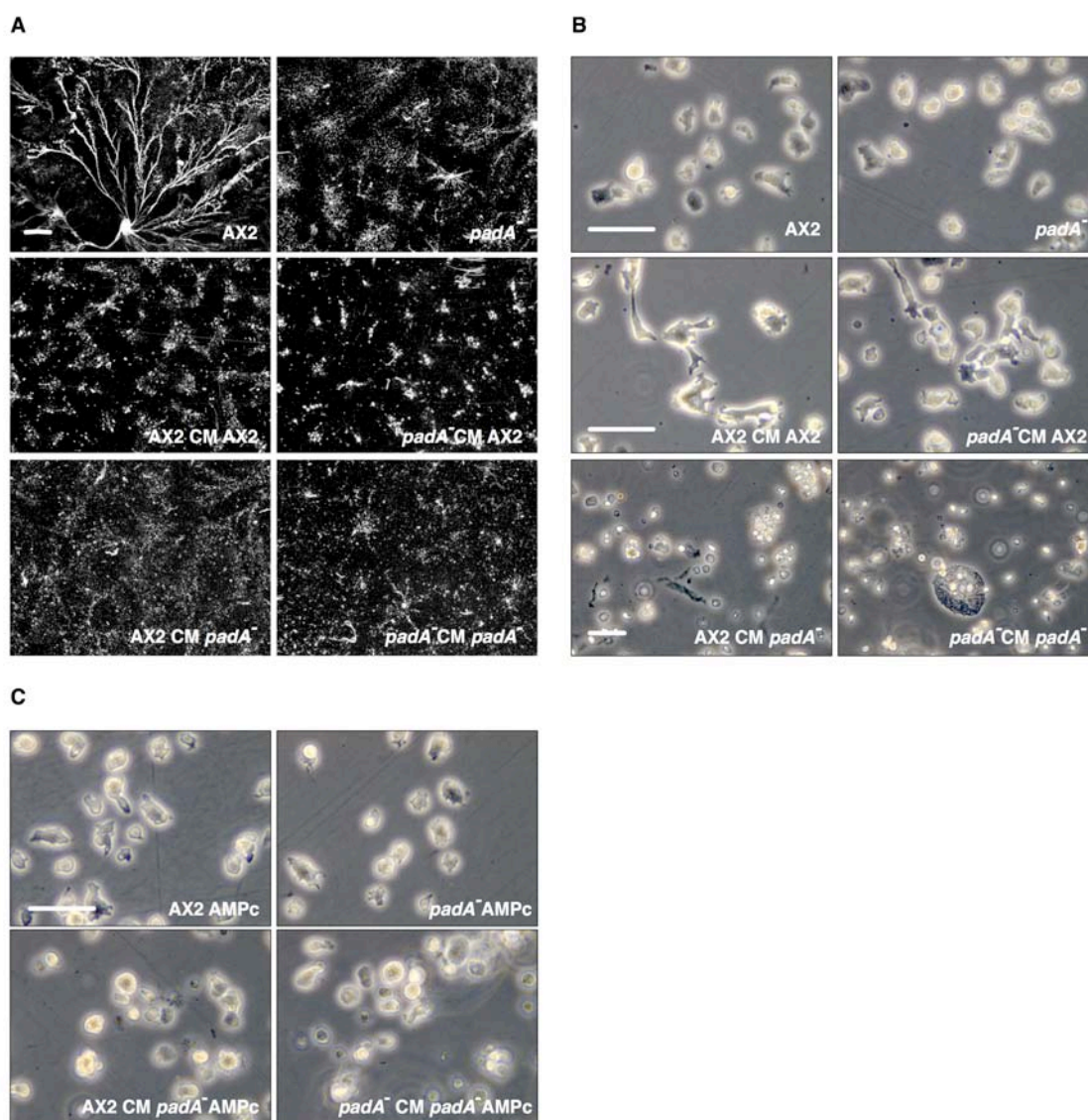


Figura 37. Efecto de los medios condicionados de AX2 y *padA*⁻ sobre su agregación y morfología celular. A) Agregación sumergida de AX2 y *padA*⁻ a las 24 h con los diferentes medios condicionados, obtenidos a partir de células en alta densidad tras 7 h de ayuno. Barra: 1 mm. B) Morfología celular a las 7 h con los caldos condicionados, C) y suplementada con 500 pM AMPc. Barra: 0,1 mm.

4.3.8 La agregación en *padA*⁻ es más sensible a la inhibición parcial de PdiA, inhibidor de la fosfodiesterasa extracelular

La fosfodiesterasa extracelular PdsA es un enzima clave en la agregación; hidroliza el AMPc extracelular, permitiendo así la desensibilización de los receptores de AMPc, por lo que su correcta regulación es fundamental y desequilibrios en la misma dan lugar a dramáticas consecuencias en la agregación (Darmon *et al.*, 1978; Sucgang *et al.*, 1997; Kessin, 1988). Pdi,

inhibidor de la actividad de PdsA, se une a ésta, y actúa disminuyendo drásticamente la afinidad de PdsA por el AMPc (Kessin *et al.*, 1979). Pdi es una proteína rica en cisteínas por lo que se inactiva de forma irreversible por el agente reductor DTT (Kessin *et al.*, 1979; Franke y Kessin, 1981). Pdi se inactiva con bajas concentraciones de DTT (1 mM), que, en concentraciones más altas (5-10 mM), inhibe de manera competitiva la propia PdsA (Devreotes y Shering, 1985). Por lo tanto, la inactivación de Pdi inducida por bajas concentraciones de DTT potencia la actividad fosfodiesterasa. Para valorar el peso de la actividad fosfodiesterasa en el fenotipo de *padA*⁻ se inhibió parcialmente Pdi en las células en agregación. En nuestras manos, 2 mM DTT añadido en el agar anula completamente la agregación de AX2, por lo que se emplearon concentraciones más bajas de DTT (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM). A las 4 horas de desarrollo, sin signos de agregación en los controles sin DTT, AX2 y *padA*⁻ han formado ya agregados celulares sin formación de *streams* previa (Fig. 38. A). Este resultado, reproducido con todas las concentraciones de DTT testadas, es el esperado, ya que corresponde al fenotipo descrito para la cepa que sobreexpresa la fosfodiesterasa extracelular PdsA (Faure *et al.*, 1988). El tamaño de estos agregados aberrantes disminuye a medida que aumenta la concentración de DTT (Fig. 38. A), posiblemente por un aumento de la actividad fosfodiesterasa. Es significativo que el tamaño de los agregados de *padA*⁻ con 0,25 mM DTT es muy similar al de AX2 con 0,5 mM, lo que sugiere una mayor sensibilidad al DTT de *padA*⁻, lo que podría indicar menores niveles del inhibidor Pdi en el mutante (Fig. 38. A).

A las 9 h de desarrollo, los controles de AX2 y *padA*⁻ ya han formado centros de agregación perfectamente definidos, mientras AX2 y *padA*⁻ con 0,25 mM DTT siguen bloqueados en el mismo punto del desarrollo, pero AX2 ha conseguido reclutar más células hacia los pseudocentros (Fig. 38. B). A tiempo final, tanto AX2 como *padA*⁻ con 0,25 mM DTT consiguen culminar, aunque lo hacen con un retraso considerable, sobre todo *padA*⁻. Las células de ambas cepas sometidas a concentraciones superiores de DTT no culminan, fenotipo ya descrito para la sobreexpresión de PdsA (Faure *et al.*, 1988).

Los resultados indican un ligero aumento en la sensibilidad del mutante *padA*⁻ hacia la inhibición de Pdi, lo que podría estar motivado por una menor cantidad de Pdi en *padA*⁻ o una actividad PdsA más alta, que se pone de manifiesto al inactivar el inhibidor.

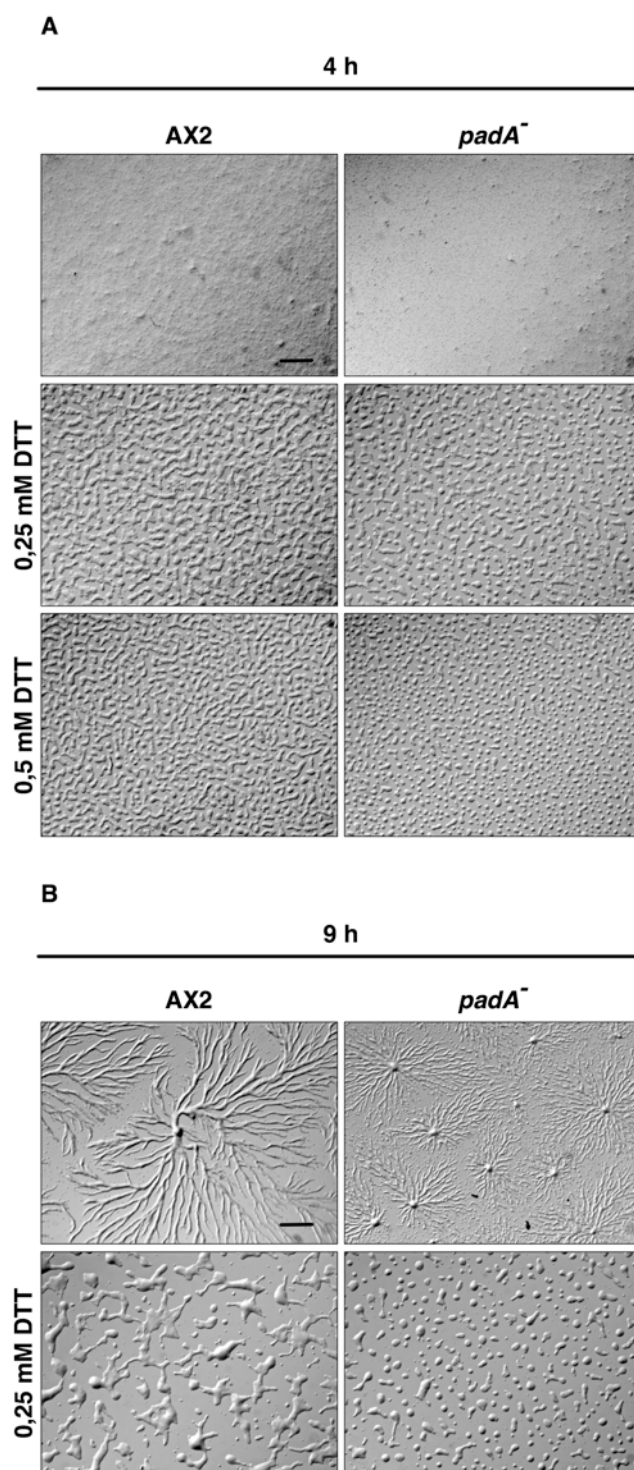


Figura 38. Efecto de la inhibición parcial de Pdi con diferentes concentraciones de DTT. A) Agregación sobre agar de AX2 y *padA*⁻ en presencia de 0, 0,25 y 0,5 mM DTT a las 4 h. **B)** A las 9 h. Barra: 1 mm.

4.3.9 Las células *padA*⁻ tienen una actividad fosfodiesterasa extracelular menor que la del tipo silvestre

Después de valorar las consecuencias de aumentar la actividad fosfodiesterasa (Fig. 38), se planteó la necesidad de medir la actividad PdsA *in vivo*. Para estimar la actividad PdsA durante la agregación de *padA*⁻, se empleó un sencillo ensayo desarrollado en el laboratorio de J.T.Bonner (Shimomura *et al.*, 1982). Al depositar una gota de células competentes para la agregación sobre una superficie (agar ultrapuro) que contenga AMPc, las células degradarán el AMPc del entorno mediante la fosfodiesterasa extracelular generando así un gradiente de AMPc que rodea la gota inicial y que percibirán las células. Éstas irán avanzando de forma radial, alejándose del borde de la gota inicial. Las células se desplazarán siguiendo el gradiente y el patrón de esta migración dependerá de la velocidad y de la concentración relativa de PdsA y AMPc. Las células serán sensibles al gradiente de AMPc generado por la PdsA y a los pulsos de AMPc de las propias células.

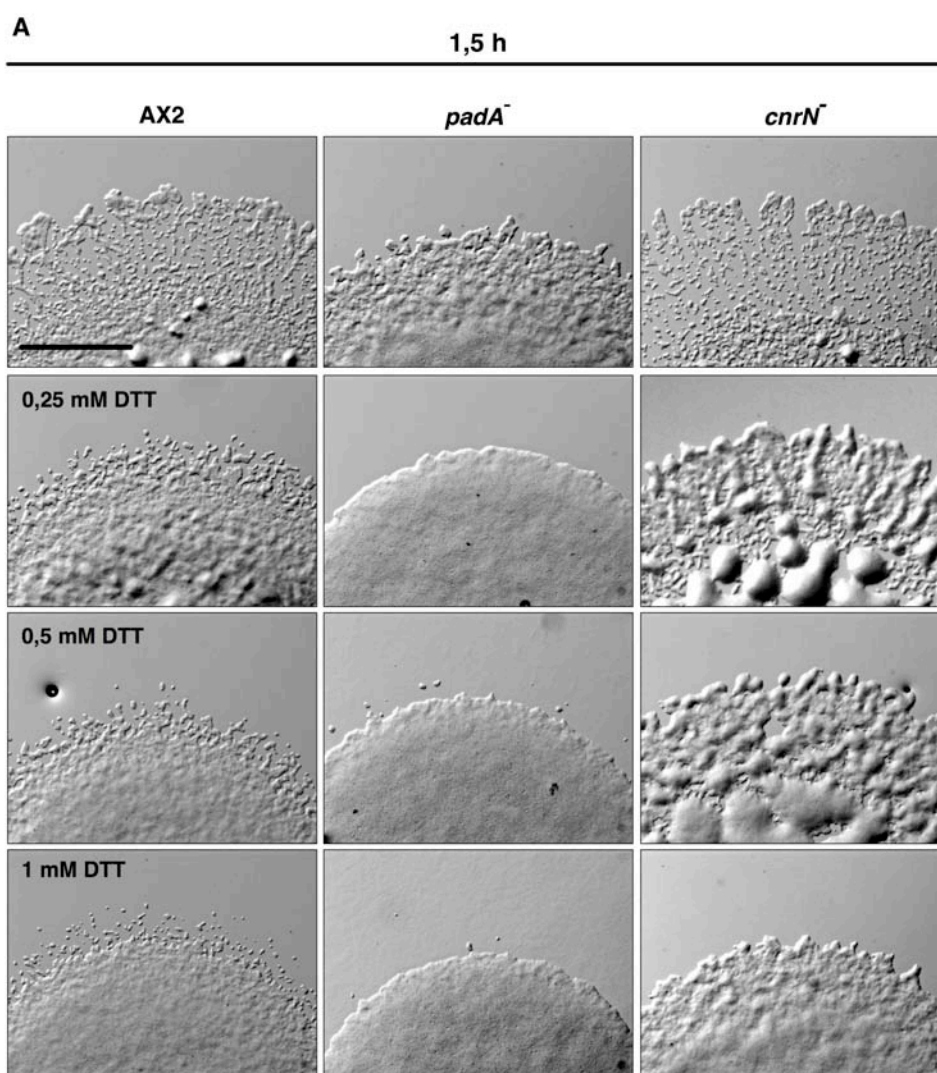
Como se observa en la Figura 39. A y B (superior), las células *padA*⁻ recorren una distancia menor que AX2 tanto a tiempos cortos (1,5 h) (Fig. 39. A) como a tiempos más largos (5 h) (Fig. 39. B) sobre un sustrato con 300 nM AMPc. Para poder valorar la influencia de los pulsos de AMPc de las propias células en el ensayo, que podría interferir con la estimación de la actividad PdsA, se empleó la cepa sobreproductora de AMPc, *cnrN*⁻ como control (Jang y Gomer, 2008). Así, podemos descartar que la señal interna tenga una influencia determinante en el resultado del ensayo, ya que *cnrN*⁻ se comporta igual que el tipo silvestre (aunque es evidente la aceleración del desarrollo por la formación de agregados dentro de la gota a tiempos cortos) (Fig. 39. A, derecha).

Repetimos el mismo ensayo añadiendo también diferentes concentraciones de DTT al agar, que ya contenía 300 nM de AMPc. El DTT en altas concentraciones inhibe la actividad fosfodiesterasa de PdsA específicamente durante la agregación, sin afectar al resto de fosfodiesterasas intracelulares (Bader *et al.*, 2007). PdsA requiere de concentraciones de DTT entre 5-10 mM para inactivarse (Devreotes y Shering, 1985), pero en este experimento, concentraciones superiores a 2 mM bloqueaban el ensayo por completo. Esto puede deberse a que el AMPc del agar anula la expresión de *pdiA* (Franke *et al.*, 1991), por lo que PdsA es más sensible al DTT.

Como se observa en las Fig. 39. A y B (filas 2, 3, y 4), tal y como se esperaba, concentraciones crecientes de DTT anulan progresivamente la migración de las células AX2, aunque se observa algo de actividad PdsA hasta 1 mM de DTT, tanto a 1,5 como a 5 h. Sin embargo, en el

mutante *padA*⁻, 0,25 mM DTT disminuyen drásticamente la actividad de PdsA y 0,5 mM la anulan por completo, lo que se pone de manifiesto por la ausencia de células migrando desde la gota. Con los datos observados sugerimos que *padA*⁻ tiene una actividad fosfodiesterasa extracelular menor que el tipo silvestre.

Para comprobar si la menor actividad fosfodiesterasa se acompañaba de menor cantidad de proteína PdsA, se analizaron por *western blot* los niveles de PdsA presentes en el medio extracelular de AX2 y *padA*⁻ tras 7 horas de ayuno (momento del desarrollo donde *pdsA* se expresa de forma máxima) (Fig. 39. C). Las proteínas presentes en el medio condicionado procedente de una alta densidad celular (1×10^7 células/mL) se precipitaron, (ver el apartado 3.5.6. de Materiales y Métodos) y se analizaron por *western blot*, para detectar la cantidad de proteína PdsA. Los niveles de proteína PdsA en *padA*⁻ son ligeramente más bajos ($\approx 30\%$) que los del tipo silvestre, si bien estos resultados no son estadísticamente significativos (Fig. 39. D).



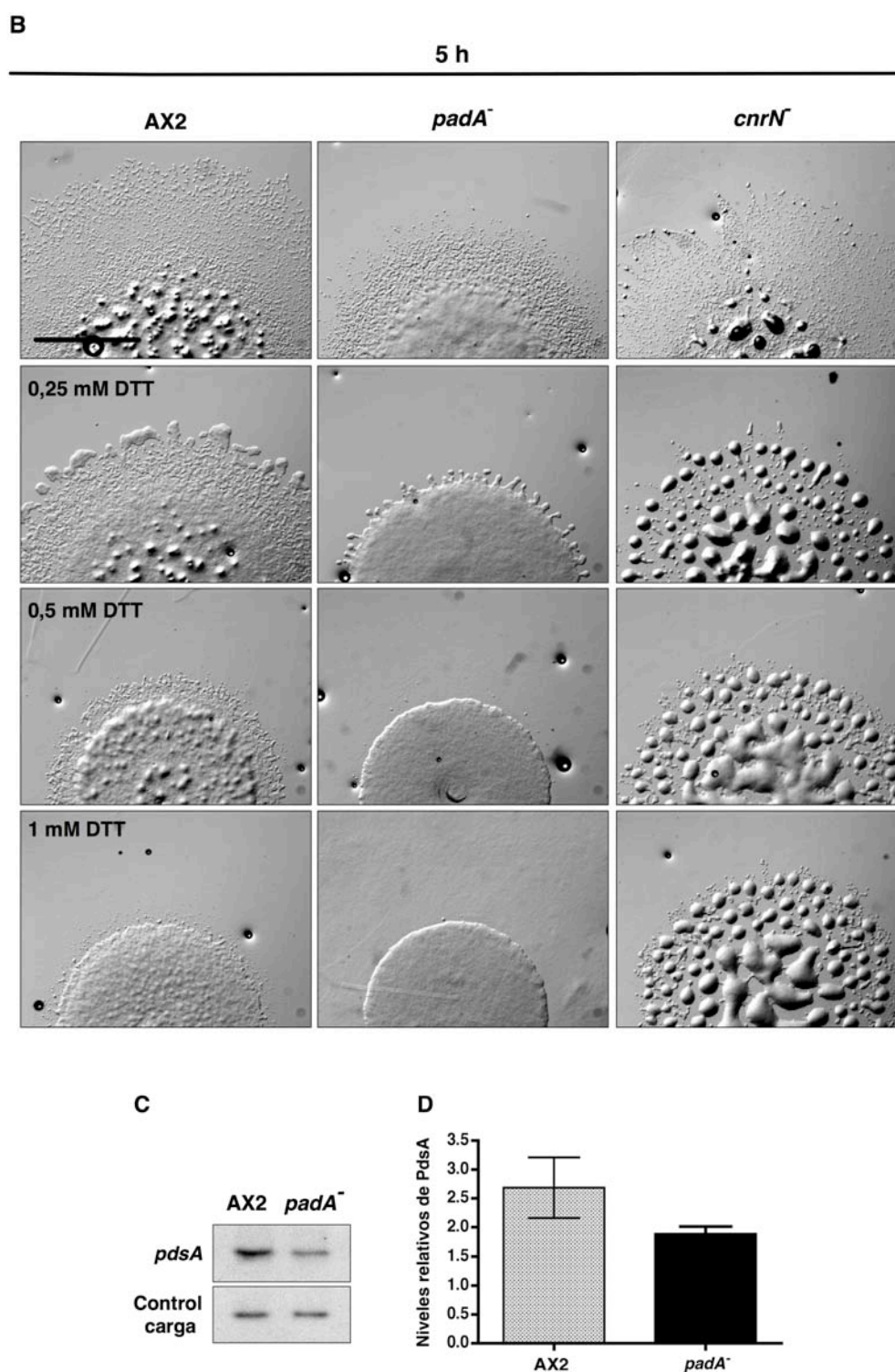


Fig. 39. Análisis de la actividad fosfodiesterasa *in vivo*. Migración de las células AX2, *padA*⁻ y *cnrN*⁻ dispuestas sobre agar suplementado con 300 nM de AMPc y con DTT, como se indica. Imágenes tomadas a las 1,5 h (**A**) o a las 5 h (**B**). (**C**) Proteína PdsA presente en el medio condicionado de 7 h de AX2 y *padA*⁻ revelada por *western blot*. (**D**) Cuantificación de la densidad/mm² de las bandas de PdsA sobre la película fotográfica, corregida para la señal de control de carga. La cuantificación se ha realizado a partir de tres experimentos independientes (Test T. *p*=0,07).

4.3.10 Las células *padA*⁻ responden a un rango de AMPc más estrecho que el tipo silvestre a través de *streams* engrosados y cortos

Las células con bajos niveles de PdsA presentan problemas de quimiotaxis, y responden a un rango de concentraciones más estrecho de AMPc que el tipo silvestre (García *et al.*, 2008). Esto se debe a que cuando estas células están expuestas a “altos” niveles de quimioatrayente, los receptores CarA se saturan rápidamente a causa de la defectuosa degradación del AMPc. Por el contrario, ante niveles “bajos” de AMPc no pueden distinguir la señal impuesta externamente de la que producen internamente. Para analizar el comportamiento de las células *padA*⁻ a este respecto, teniendo en cuenta los datos que apuntan a que produce menos PdsA, se sometieron a un ensayo para medir su capacidad quimiotáctica (protocolo de M. Nelson obtenido de *dictybase*, ver Material y Métodos 3.8.4.2). El ensayo consiste en analizar el desplazamiento de las células competentes para la agregación hacia una fuente de AMPc situada a una distancia de 3,5 mm. El ensayo se realizó con AX2, *padA*⁻ y *cnrN*⁻ (Jang y Gomer, 2008) que una vez más, se utilizó como control para ver cómo un exceso de señal interna afectaba a la respuesta quimiotáctica. Se testaron 7 concentraciones diferentes de AMPc (1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) y un control sin quimioatrayente, que no se muestra, donde ninguna célula sale de la gota.

A tiempos muy tempranos (1 h 30 min) se observó que ya existía respuesta quimiotáctica en AX2 y *cnrN*⁻ hacia las concentraciones más altas de AMPc, pero no en *padA*⁻, que presentaba un retraso en la quimiotaxis a tiempos cortos y no comenzaba a responder hasta las 2 h 15 min (no mostrado). Tras 6 h 15 min (Fig. 40) se observa que las células AX2 responden a la mínima concentración de AMPc testada, 1 μ M, no así *padA*⁻ ni *cnrN*⁻. De la misma manera, la respuesta a las concentraciones de AMPc más altas también está afectada en *padA*⁻, ya que no se aprecia diferencia en la respuesta a 100 μ M y 200 μ M, e incluso se percibe un retraimiento de las células *padA*⁻ ante 200 μ M de AMPc. Los resultados indican que las células *padA*⁻ y *cnrN*⁻ responden a un rango de quimioatrayente más estrecho que el tipo silvestre.

La respuesta de *padA*⁻, además de menos intensa, es morfológicamente diferente a la del tipo silvestre. Los *streams* de AX2 son definidos, alargados y están formados por grupos estrechos de células, igual que en el mutante *cnrN*⁻ (Fig. 40). Sin embargo, *padA*⁻ responde al quimioatrayente formando *streams* más cortos, más anchos, y menos definidos. Este fenotipo, donde las células se posicionan paralelas unas a otras en vez de “cabeza-cola”, se ha descrito en células con baja producción de PdsA (García *et al.*, 2008). Según estos autores, esta distorsión se debe a la alteración del gradiente de AMPc, causada por la deficiente

degradación de éste. Así, un grupo de células que produce más AMPc que las del entorno favorece la formación de *streams* gruesos. La formación de *streams* gruesos es poco plausible en el tipo silvestre, ya que una acumulación local de células conlleva una alta producción de PdsA, que impide la formación de estas agrupaciones celulares engrosadas.

Además de las diferencias ya señaladas, es reseñable la formación de *mounds* en las gotas de *cnrN*⁻, indicativo de la intensidad de la señal interna de AMPc existente en esta cepa. AX2 también responde débilmente a la señal interna formando primordios de *mounds*, sin embargo *padA*⁻ no muestra ninguna señal de agregación, lo que de nuevo demuestra la baja intensidad del pulso de AMPc. El ensayo también se realizó con una distancia de 5 mm entre las gotas de AMPc y las células del análisis, sin diferencias apreciables respecto a lo expuesto anteriormente.

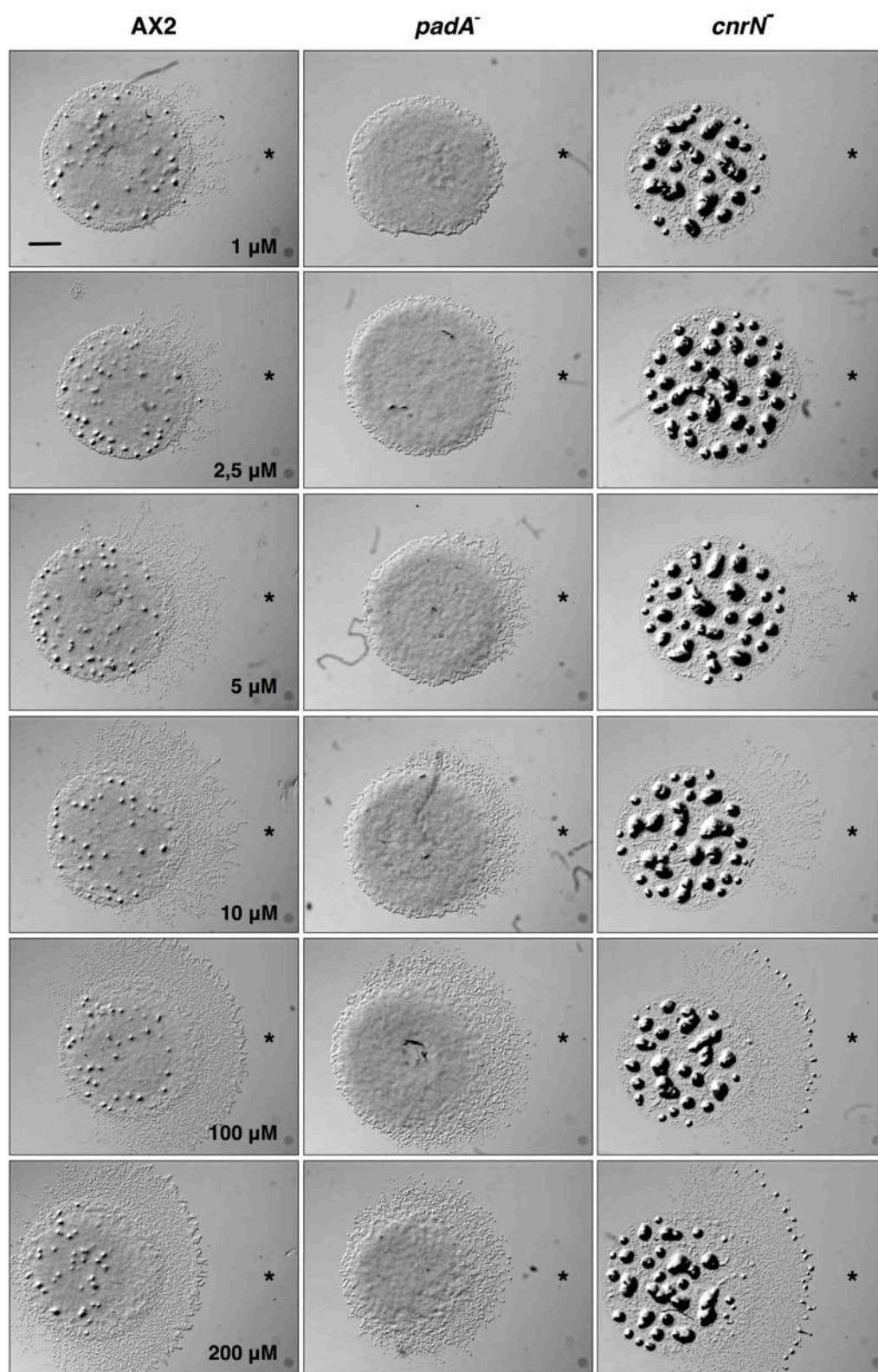


Figura 40. Respuesta quimiotáctica de las células AX2, *padA*⁻ y *cnrN*⁻ a diferentes concentraciones de AMPc. El asterisco (*) indica la posición de la fuente de AMPc. Barra: 1 mm.

4.3.11 Las células *padA*⁻ producen tanto AMPc extracelular como el tipo silvestre

En relación a todos los resultados anteriores se hizo evidente la necesidad de conocer la producción de AMPc en el mutante *padA*⁻. Se intentó medir la cantidad de AMPc producida por las células en respuesta al estímulo de AMPc, siguiendo el protocolo de Van Haastert (2006) (ver Material y Métodos 3.8.4.1.2). Desgraciadamente, no fue posible realizar esta medida por las características técnicas del *kit* de detección de AMPc, pero sí fue posible cuantificar la cantidad de AMPc presente en el medio condicionado de células AX2 y *padA*⁻ en ayunas durante 7 horas y en alta densidad celular (Fig. 41). Con este propósito, se prepararon caldos condicionados a partir de 1×10^9 células/mL de AX2 y *padA*⁻ en ayunas durante 7 h y se midió el AMPc extracelular contenido en estos caldos con un *kit* comercial basado en un anticuerpo anti-AMPc (Materiales y Métodos 3.8.4.1.1). Las células *padA*⁻ acumulan tanto AMPc como el tipo silvestre. La cantidad de AMPc de AX2, por cada 1×10^7 células, es 1.009 ± 0.099 pmol mientras que *padA*⁻ tiende a una mayor concentración: 1.477 ± 0.179 pmol, sin llegar a ser una diferencia estadísticamente significativa. Es importante aclarar que la preparación de los extractos se realizó sin añadir DTT (inhibidor de la fosfodiesterasa extracelular), con lo cual los datos obtenidos son el resultado de la producción y degradación intrínsecas de las propias células.

La tendencia de *padA*⁻ a producir/acumular más AMPc extracelular podría deberse a una mayor actividad AcaA en *padA*⁻, poco plausible por la restauración del fenotipo en agregación en alta densidad celular (Fig. 34); o ser el resultado de una menor degradación del AMPc, por la menor actividad fosfodiesterasa que hemos documentado (Fig. 39) y favorecido por la alta densidad celular. Además, la presencia de tan elevado número de células podría inducir una mayor producción del AMPc que desensibilizara a los receptores del AMPc CarA, sensibilizados por la deficiente degradación del AMPc. Existen evidencias en la literatura de mutantes con actividad PdsA comprometida y que sólo agregan en alta densidad celular (Sucgang *et al.*, 1997).

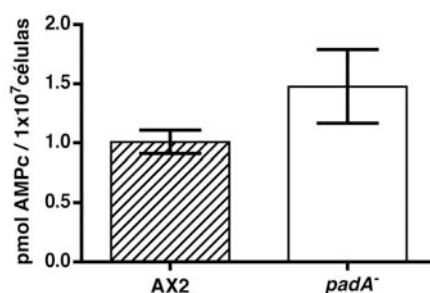


Figura 41. Cuantificación del AMPc extracelular a partir del sobrenadante de AX2 y *padA*⁻ tras 7 horas de ayuno en alta densidad (1×10^9 células/mL). La gráfica representa la media de $n=3 \pm$ SD. Las diferencias no son significativas (Test T. Valor $p= 0,0848$). SD: Desviación estándar de la media.

4.3.12 La adhesión celular durante el desarrollo está afectada en el mutante *padA*⁻

La adhesión entre célula-sustrato y entre célula-célula es esencial en el proceso de agregación en *D. discoideum*. En consecuencia, defectos en la expresión génica de proteínas de adhesión muestran defectos severos durante la agregación, y en múltiples aspectos del desarrollo (Coates *et al.*, 2001; Siu *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2006; Benabentos *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Sriskanthadevan *et al.*, 2011). La expresión de los tres principales genes de adhesión intercelular de *D. discoideum*, *cadA*, *csA* y *tgrC*, es inducible, en diferente medida por AMPc, contienen elementos de respuesta a AMPc en sus promotores y su expresión está estrictamente regulada en el desarrollo (Yang *et al.*, 1997; Siu *et al.*, 1988; Desbarats *et al.*, 1992; Iranfar *et al.*, 2003; Dynes *et al.*, 1994). El defecto en agregación de *padA*⁻ podría estar causado o exacerbado por un déficit/exceso en alguna de las proteínas de adhesión, ya fuera éste el origen del defecto o la consecuencia de una señalización del AMPc alterada.

4.3.12.1 La adhesión célula-célula sensible al EDTA está ligeramente afectada en *padA*⁻

A través de un ensayo clásico, se valoró la adhesión dependiente de Ca^{2+} en el inicio del desarrollo (hasta 3 h), mediada por CadA, que establece uniones intercelulares sensibles a la presencia del quelante EDTA (Brar *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1996). Las células AX2 y *padA*⁻ en alta densidad (2×10^7 células/mL) se mantuvieron en ayuno y agitación durante 3 h (a partir de las ≈ 3 h comienza la expresión de *csA*, resistente a EDTA), se diluyeron y disgregaron mecánicamente antes de tomar dos alícuotas de cada cepa; una de las cuales se incubó en presencia de 10 mM EDTA. Ambas se sometieron a agitación constante

y a los 20, 40 y 60 min se cuantificó el número de células no reasociadas. De este valor se obtuvo el porcentaje de adhesión temprana de cada cepa. En AX2 se observa una dramática disminución de las uniones dependientes de Ca^{2+} en presencia de EDTA (Fig. 42. A), en términos similares a los publicados (Wong *et al.*, 2002). AX2 pasa de obtener valores de adhesión cercanos al 90% en ausencia del quelante a un 18-2,5% en presencia del mismo. En ausencia de EDTA, *padA*⁻ mantiene valores semejantes al silvestre, aunque 20 min tras la disgregación muestra un nivel de adhesión un 10,4% inferior. En presencia de EDTA las diferencias son menores debido a la variabilidad intrínseca existente, pero a pesar de ello, a los 20 min, *padA*⁻ muestra una adhesión un 21% inferior al del silvestre.

4.3.12.2 La adhesión célula-célula está comprometida en el desarrollo temprano de *padA*⁻

Para valorar la adhesión temprana en *padA*⁻ de forma general, se realizó un ensayo descrito por Roissin-Bouffay y col., con algunas modificaciones (Roissin-Bouffay *et al.*, 2000). Este ensayo consiste en depositar las células en ayuno sobre filtros de nitrocelulosa y disgregar las estructuras mecánicamente a los tiempos de desarrollo estipulados, en este caso: 0, 0,5, 2,5, 4, 6 y 8 h, porque este rango abarca la expresión de las tres proteínas de adhesión intercelular durante el desarrollo temprano, *cadA*, *csA* y *tgrC*, en este orden temporal de expresión (Wong *et al.*, 1996; Siu *et al.*, 1988; Desbarats *et al.*, 1992; Dynes *et al.*, 1994). Una vez disgregadas, se sometieron a una agitación constante durante 20 min y se cuantificaron las células no reasociadas, para estimar el porcentaje de adhesión. En la Figura 42. B se observa claramente que las células *padA*⁻ tienen una adhesión intercelular significativamente menor a las 4, 6 y 8 h del desarrollo.

Para comprobar si el defecto en la adhesión se mantenía a lo largo del desarrollo, se disgregaron estructuras en estadios más avanzados, concretamente *tipped-mound* y *first finger*. Debido a la consistencia de la cubierta glicoproteica que cubre las estructuras, se empleó una aguja 21 G para disgregarlas mecánicamente. Desde este paso inicial se apreciaba una menor resistencia en las estructuras de *padA*⁻, ya que se requerían menos succiones con la jeringa para conseguir separarlos. Tras someter las células individuales, a agitación constante, se contaron las células no reasociadas a 10, 20, 30, 60, 120 y 180 min. En todos los tiempos analizados, el porcentaje de células reasociadas es menor en *padA*⁻ que en AX2 (Fig. 42. C). Estos resultados demuestran que el defecto en adhesión de *padA*⁻ se prolonga en el desarrollo.

Se analizó la adhesión al sustrato durante el desarrollo, mediada principalmente por genes de la familia Sib (*similar to integrin β*) (Cornillon *et al.*, 2006, 2008) y se observó una ligera disminución respecto a la de AX2, pero sin significancia estadística (Fig. 42. D).

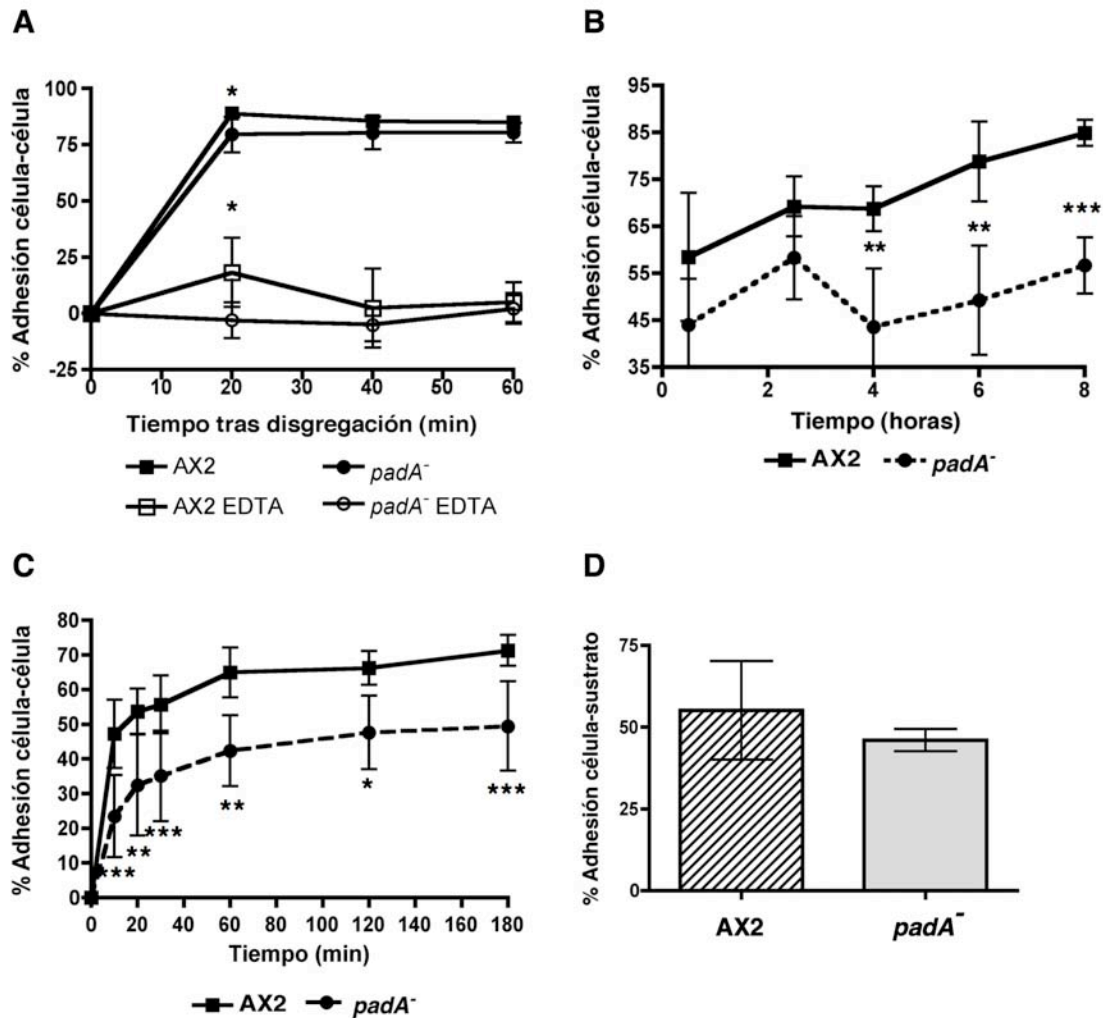


Figura 42. La adhesión intercelular está afectada durante la agregación y la fase de *first finger* en *padA*⁻. **A)** Cuantificación de la adhesión sensible a EDTA tras 3 h de desarrollo. Se representa la media de 8 experimentos \pm S.D. **B)** Cuantificación de la adhesión durante las 8 primeras h del desarrollo a partir de estructuras sobre filtros. Se representa la media de 5 experimentos \pm SD. **C)** Cuantificación de la adhesión intercelular durante las fases de *tipped mound* y *first finger*. Se representa la media de 10 experimentos \pm SD. **D)** Cuantificación de la adhesión al sustrato en QQ2. Se representa la media de 8 experimentos \pm SD.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$. SD: Desviación estándar de la media.

4.3.12.3 La transcripción de genes de adhesión está regulada a la baja en *padA*⁻

Para comprobar si los defectos de adhesión reflejaban defectos en la expresión génica de las principales proteínas de adhesión, se analizaron sus niveles de ARNm por RT-PCR semi-cuantitativa y cuantitativa. Para ello se diseñaron cebadores específicos (Tabla 1, Material y Métodos) para los genes *cadA*, *csA*, *tgrC*, *sibA* y *sibB* y se valoraron los niveles relativos de ARNm correspondiente a estos genes desde el inicio del desarrollo hasta la formación de centros de agregación bien definidos.

En la Figura 43. A se puede observar que los tres genes de adhesión intercelular *cadA*, *csA* y *tgrC* presentan niveles de expresión más bajos en el mutante *padA*⁻, además de un retraso temporal en su máximo de expresión. Este resultado se corroboró con un análisis cuantitativo de la expresión (Fig. 43. C), del que se muestran gráficas representativas de las RT-PCR cuantitativas para los tres genes.

En el caso de *cadA*, lo más representativo es el claro retraso temporal de expresión que muestra en *padA*⁻, con un desplazamiento del pico de expresión de 8 h (AX2) a 10 h (*padA*⁻). Este retraso hace que, a las 4 h, la diferencia en la expresión sea 4,5 veces más baja en *padA*⁻ (Fig. 43. A y C). Es significativo que a pesar del retraso, *cadA* alcanza en *padA*⁻ niveles de expresión silvestres (sólo un 8% inferior). El análisis corrobora la regulación a la baja de *cadA* en medio rico (HL5) detectada para *padA*⁻ en el análisis por micromatrices; en este ensayo la diferencia es de 2,4 veces respecto a AX2.

La expresión de *csA* en el mutante *padA*⁻ está retrasada, y el pico de expresión se desplaza de 6 h (AX2) a 8 h (*padA*⁻) (Fig. 43. A y C). En este caso *padA*⁻ (8 h) sólo alcanza la mitad de los niveles de expresión de *csA* en AX2 (6 h) y la regulación a la baja se extiende a todos los demás tiempos analizados.

tgrC también presenta un claro retraso en el patrón de expresión durante el desarrollo temprano que se refleja en el desplazamiento del pico de expresión de 8 (AX2) a 10 h en *padA*⁻ (Fig. 43. A y C). *padA*⁻ sólo alcanza aproximadamente la mitad del nivel máximo de expresión alcanzado por AX2. Este análisis cuantitativo ha permitido también corroborar la regulación al alza de *tgrC* en medio HL5, nunca inferior al 20% respecto a AX2 (no mostrado) y que ya se había observado en el estudio por micromatrices de ADN (Tabla 7).

En el mutante *padA*⁻ los genes responsables de la adhesión célula-célula tienen un patrón temporal de expresión retrasado y alcanzan niveles de expresión más bajos con respecto al

tipo silvestre. La contribución de este defecto al fenotipo *padA*⁻, o si es su consecuencia (por una insuficiente estimulación por AMPc), precisa de más experimentos.

Para completar el estudio, se analizó la expresión de los genes de adhesión al sustrato *sibA* y *sibB*. Se había observado una tendencia a la baja en la adhesión al sustrato, que, como se observa en la Figura 43. C, coincide con niveles más bajos de ARNm de estos genes. En el caso de *sibA* únicamente se analizaron las primeras 4 h del desarrollo, porque su expresión se restringe al tiempo entre 0-4 h en AX2 (*Dictybase*: www.dictybase.com). La expresión temporal en *padA*⁻ de *sibA* y *sibB* es similar al silvestre, pero el nivel de expresión es más bajo en todos los tiempos analizados. Los niveles de ARNm de *sibA* a las 0 h en medio HL5, también están bajos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el análisis por micromatrices (Tabla 7).

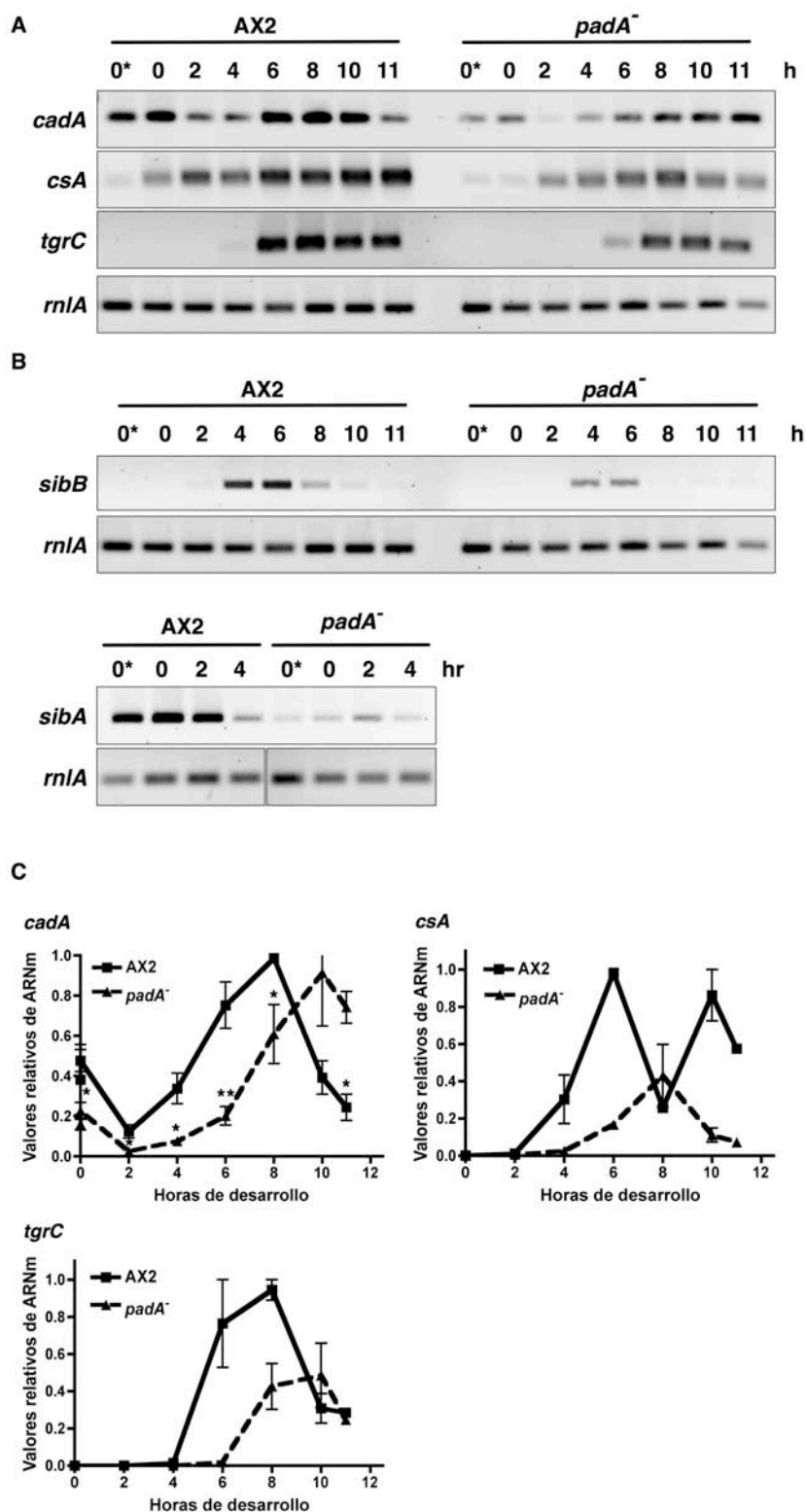


Figura 43. Análisis transcripcional de los genes de adhesión. A) RT-PCR semi-cuantitativa de los genes de la adhesión *cadA*, *csA* y *lagC* durante el crecimiento (0*) y el desarrollo temprano (0-11 h); y B) de los genes de adhesión al sustrato *sibA* y *sibB*. C) RT-PCR cuantitativa de los genes *cadA*, *csA* y *lagC* durante el desarrollo temprano (0-11 h). Se representa la media de $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ (error estándar). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$. En todos los experimentos se empleó el gen *rnIA* como control de carga.

4.3.13 La transcripción de genes implicados en la señalización del AMPc está regulada a la baja en *padA*⁻

El fenotipo del mutante *padA*⁻ durante la agregación sugiere un defecto en la regulación de los genes implicados en la señalización del AMPc. Se analizaron los niveles de expresión de *acaA* (adenilato ciclasa específica de la agregación), *carA* (receptor del AMPc durante la agregación), *pdsA* (fosfodiesterasa extracelular), *pdiA* (inhibidor de PdsA), y *regA* (fosfodiesterasa intracelular) durante las primeras 11 h del desarrollo. Además, se analizaron dos genes cuya expresión es dependiente de AMPc, *cbpA* (proteína de unión a calcio) y *gpaB* (la subunidad Gα2 de la proteína G heterotrimérica asociada a CarA). La expresión de todos ellos es inducible por AMPc, excepto, *pdiA*, que es represible por AMPc (Franke *et al.*, 1991) y *regA*, cuya actividad, pero no su expresión, es activada por AMPc (Shaulsky *et al.*, 1998). Los genes *pdsA*, *carA* y *gpaB*, son inducibles pero no dependientes de AMPc (Iranfar *et al.*, 2003).

Se diseñaron cebadores para cada uno de los genes (Tabla 1, Material y Métodos) y a partir del ADNc del desarrollo temprano (0-11 h) se analizó su patrón de expresión por RT-PCR semi-cuantitativa, utilizando como control el gen ribosomal *rnlA*. (Fig. 44. A).

Como se observa en la Figura. 44. A, la expresión de todos los genes inducibles por AMPc analizados está regulada a la baja en el mutante *padA*⁻. Los más afectados son *pdsA*, *carA* y *acaA*. Además, en *pdsA* y *carA* se observa un retraso en el tiempo de inicio de la expresión de su ARNm. EN *carA* se observa, probablemente por este retraso inicial, un desplazamiento del pico máximo de expresión, de 6 a 8 h. *pdiA* se expresa en menor medida en *padA*⁻, pero con un patrón temporal silvestre. *regA*, muestra niveles de ARNm próximos a los de AX2 y con un patrón temporal también silvestre.

Para corroborar este resultado se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de *acaA*, *carA*, *pdsA*, *pdiA* y *regA* por RT-PCR cuantitativa mostrado en la Figura 44. B. En todos los casos se observa la misma tendencia a la baja observada para estos genes en el análisis semi-cuantitativo. En el análisis correspondiente a *carA* (Fig. 44. B) se confirma el retraso en el patrón temporal de expresión y el desplazamiento del pico máximo de expresión de 6 a 8 h. En el caso de *pdsA*, no se aprecia el retraso en el inicio de la expresión en el mutante, y no se aprecia un pico de expresión claro, que en AX2 se sitúa a las 10 h (con otro pico anterior a las 6 h) y en *padA*⁻ abarca desde las 6 hasta las 10 h, aunque con un pico ligeramente acentuado a las 8 h. Para *pdiA*, también se confirma la regulación a la baja y, como se observa en su correspondiente gráfica, el pico de expresión se mantiene a las 4 h, igual que AX2. *regA*, no muestra un cambio en la expresión significativo, tampoco en el patrón temporal.

Del análisis estrictamente cuantitativo se extrae que *acaA* se expresa 2,8 veces menos en *padA*⁻ que en el tipo silvestre a las 10 h, donde ambas se expresan de forma máxima. *carA* se expresa entre 1,8-1,3 veces menos en *padA*⁻ (8 h) respecto a AX2 (6 h) en su punto de máxima expresión, que como se ha mencionado, no coincide. Estas diferencias a la baja se mantienen en mayor o menor medida en todos los tiempos analizados, tanto en *carA* como en *acaA*. En el caso de *pdsA*, su expresión a las 8 h en *padA*⁻ es 2,3 veces inferior a la de AX2 a las 10 h (pico de expresión) y 1,93 veces inferior que la de AX2 a las 6 h (primer pico de expresión).

El gen *pdiA*, a las 4 h del desarrollo, donde tiene su pico de expresión en ambas cepas (Fig. 44. B), se expresa 2,32 veces menos en *padA*⁻ respecto a AX2. *regA*, se expresa de forma prácticamente silvestre en *padA*⁻ y alcanza el 80-94% de los niveles de AX2 a las 4 h (pico de expresión máxima).

De los resultados mostrados se extrae que los genes inducidos por AMPc en el mutante *padA*⁻ sean o no dependientes de los pulsos de AMPc, no alcanzan los niveles de inducción que se obtienen en el tipo silvestre y los tres genes directamente implicados en el establecimiento de los pulsos (*acaA*, *carA* y *pdsA*) están entre los más afectados.

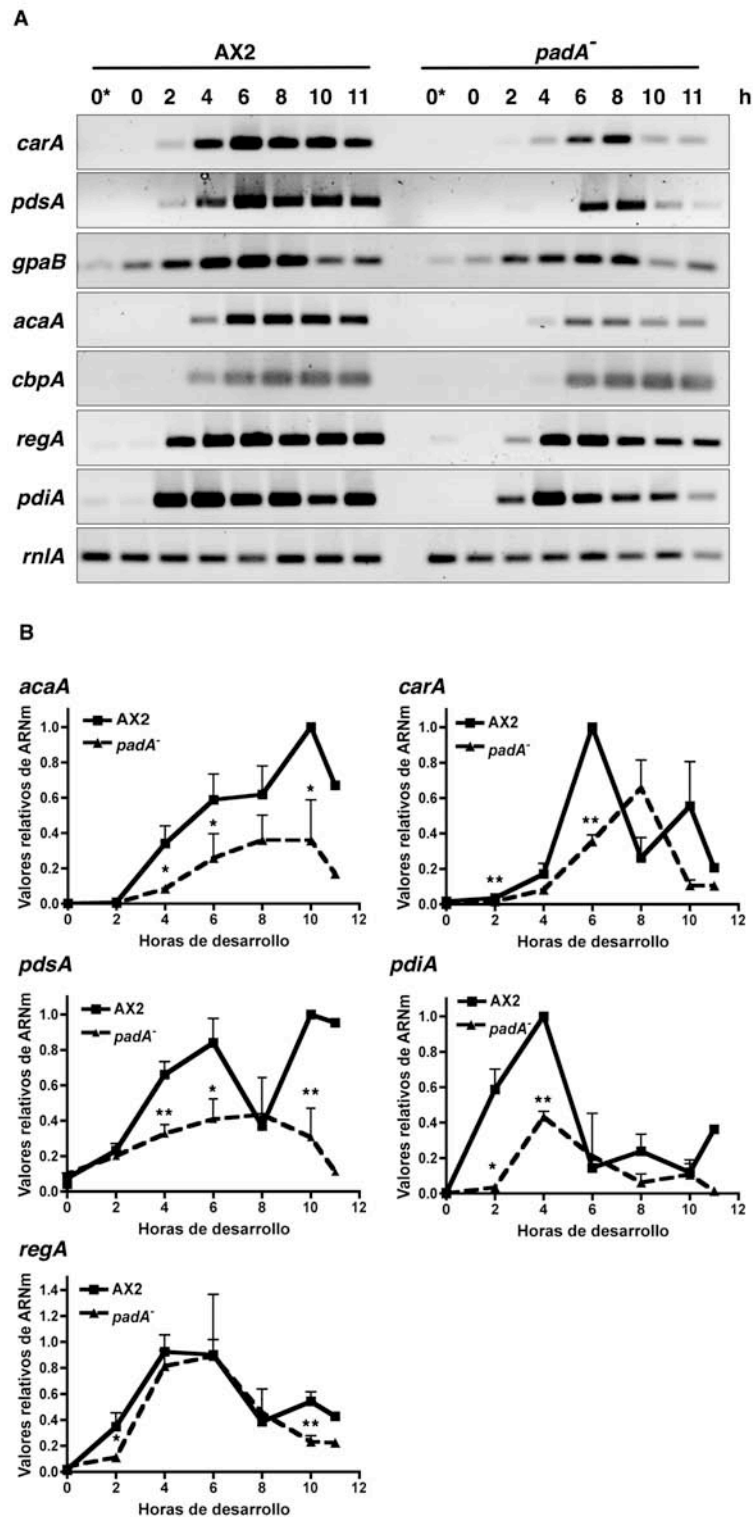


Figura 44. Análisis transcripcional de los genes implicados en el relé del AMPc durante el desarrollo temprano. A) Análisis por RT-PCR semi-cuantitativa de genes del relé del AMPc durante el crecimiento (0*) y el desarrollo temprano (0-11 h). Se muestra un experimento representativo. **B)** Análisis por RT-PCR cuantitativa de la transcripción de estos genes. Se representa la media de $n \geq 3 \pm \text{SD}$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$. En ambos análisis se empleó el gen *rnlA* como control de carga. (SD: Desviación estándar).

4.3.14 Expresión espacial de *acaA* y *pdsA* en estructuras tempranas del desarrollo

Para completar el estudio de la regulación transcripcional de los genes implicados en la señalización del AMPc, se analizó el patrón de expresión espacial de *acaA* y *pdsA* en estructuras del desarrollo temprano por la técnica de hibridación *in situ*. Se prepararon ribosondas sentido y antisentido para cada uno de los genes a partir de vectores portadores del ADNc del gen de interés (apartado 3. 7. 4. 5 de Materiales y Métodos). Se seleccionaron y fijaron estructuras del desarrollo que abarcaban el inicio de la agregación (previo a la formación de *streams*), el *streaming* propiamente dicho y, formaciones tipo *loose mound* (estadio posterior al *streaming*). Las estructuras se hibridaron con cantidades idénticas de ribosonda.

En la Figura 45. A se observa el patrón de expresión espacial del gen *acaA* en los diferentes estadios del inicio de la agregación en AX2 y *padA*⁻. En las estructuras pre-agregativas se observa una señal homogénea en AX2, al igual que en las estructuras *padA*⁻ del mismo estadio, en donde no se observan cambios apreciables en la distribución espacial de la expresión. Sin embargo la disminución en la intensidad de la señal es muy evidente en las estructuras *padA*⁻ de este estadio inicial; observación que concuerda con el análisis cuantitativo de la expresión para este gen (Fig. 44. A y B). En los *streams* de AX2 (Fig. 45. A), el patrón espacial de la expresión de *acaA* también es homogéneo, característica que se mantiene en los *streams* de *padA*⁻. En este estadio se pone de manifiesto el fenotipo del mutante en el *streaming*, con la formación de numerosos y pequeños territorios donde se aprecia una ligera disminución en la intensidad de la señal de *acaA*, aunque en menor medida que en el estadio anterior. En la fase de *loose mound* (Fig. 45. A), donde la distribución de la señal de *acaA* es homogénea en ambas cepas, se vuelve a hacer evidente el empobrecimiento de la intensidad de la señal en el mutante. En términos generales, el patrón de expresión de la ribosonda antisentido de *acaA* en AX2 es similar al descrito para el promotor 1 del mismo gen (Galardi-Castilla *et al.*, 2010). Las estructuras *padA*⁻, aunque sin expresión espacial alterada, muestran una clara disminución en la intensidad de la expresión de *acaA*.

El análisis de la expresión espacial del gen *pdsA* al inicio del desarrollo, del mutante *padA*⁻, ofreció un resultado similar al que se acaba de describir para el gen *acaA* (Fig. 45. B). Se aprecia un claro descenso en la intensidad de la tinción en el mutante en todos los estadios analizados. Pero es en las estructuras tipo *loose mound* donde, además de la menor intensidad, la expresión espacial difiere de la de AX2. En AX2 se aprecia un enriquecimiento de la tinción en células de la periferia y una disminución en las de la parte interna, patrón

ausente en *padA*. Esta expresión diferencial está descrita para el promotor de la agregación de *pdsA*, que comienza a perder su expresión en las células con destino pre-tallo (las del centro del *loose mound*) (Hall *et al.*, 1993; Weening *et al.*, 2003) y no se detecta en el mutante (Fig. 45. B).

El análisis por hibridación *in situ* de los genes *acaA* y *pdsA* en el mutante refuerza el análisis por RT-PCR cuantitativa (Fig. 44. B), pero no revela diferencias significativas en el patrón de expresión espacial temprano de *acaA* en *padA*⁻. *pdsA*, sin embargo, sí presenta una alteración en su patrón espacial de expresión en el estadio *loose mound*.

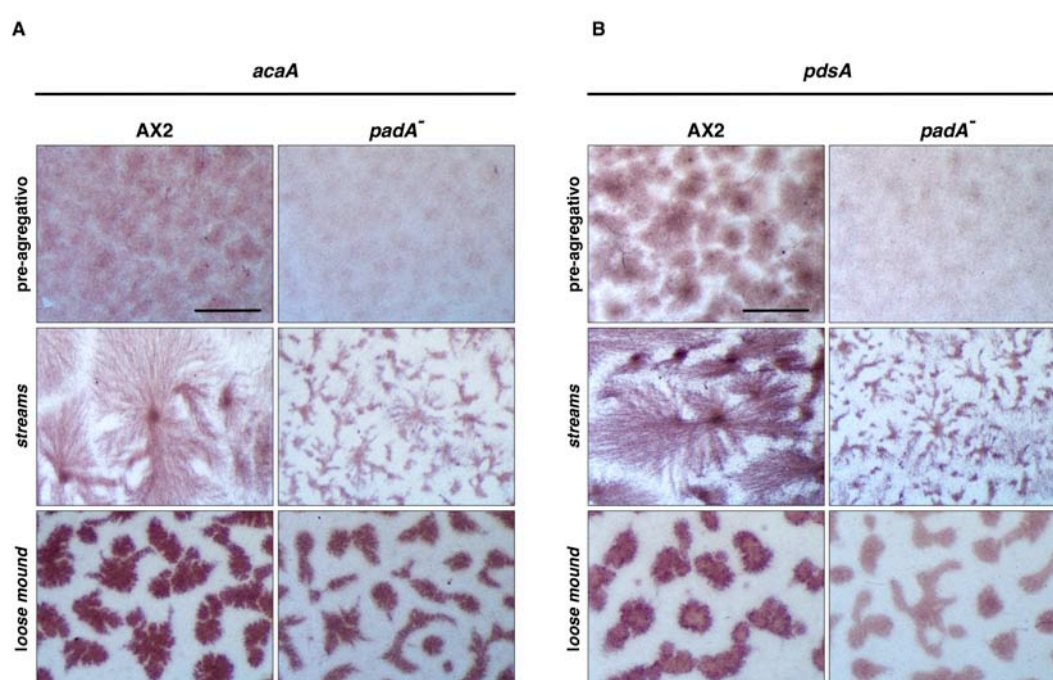


Figura 45. Patrón de expresión espacial de los genes *acaA* y *pdsA* durante los estadios *stream-loose mound*. A) *acaA*. La tinción para la detección de la señal del ARNm se mantuvo durante 45 min (tanto en AX2 como en *padA*⁻). B) *pdsA*. La tinción se mantuvo únicamente durante 15 min. Barra: 1 mm.

4.3.15 Regulación de los promotores específicos de la agregación de *acaA*, *pdsA* y *carA* en el mutante *padA*⁻

D. discoideum pertenece al único grupo (grupo 4) de los dictiostélidos que emplea el AMPc como quimioatrayente (Schaap, 2011b). Los genes *acaA*, *pdsA* y *carA* han adquirido un promotor distal que dirige su expresión específicamente durante la agregación y el desarrollo más temprano (Galardi-Castilla *et al.*, 2010; Faure *et al.*, 1990; Louis *et al.*, 1993;

Alvarez-Curto *et al.*, 2005) y se ha propuesto que la adaptación al uso del AMPc como quimioatrayente se ha llevado a cabo mediante la adquisición de estos promotores distales (Alvarez-Curto *et al.*, 2005). La existencia de estos promotores y el patrón transcripcional de los genes del relé del AMPc en *padA*⁻, hizo valorar si PadA regula específicamente la actividad de estos promotores. Para este análisis disponíamos de cebadores específicos para cada región promotora (Tabla 1, Material y Métodos), ya que originan diferentes inicios de la transcripción, y de la fusión del promotor 1 de *acaA* a β -galactosidasa (Galardi-Castilla *et al.*, 2010).

4.3.15.1 Análisis transcripcional del promotor 1 de *acaA* en *padA*⁻

La expresión del gen *acaA* está dirigida por tres promotores alternativos, siendo el promotor distal (promotor 1) el más activo durante el inicio del desarrollo y específico de la agregación (Galardi-Castilla *et al.*, 2010). Para su estudio en *padA*⁻, se utilizó un vector de expresión donde la región 5'UTR que abarca el promotor 1 ("pr1"), se había fusionado al gen reportero β -galactosidasa lábil (Galardi-Castilla *et al.*, 2010). Esta variante de la β -galactosidasa permite seguir la actividad transitoria del promotor *in vivo*, con un desfase máximo de 1 h en su expresión (Detterbeck *et al.*, 1994). Células AX2 y *padA*⁻ que se habían transfectado con el vector *pr1acaA::ile-gal*, se sometieron a ayuno y depositaron sobre filtros (teflón®) (2,04 x 10⁶ cells/cm²) para inducir la formación de *streams*. Tras fijar los *streams* se reveló la actividad promotora del "pr1" de *acaA* (azul en Fig. 46. A) y se pone de manifiesto la menor actividad del "pr1" de *acaA* en el mutante. De hecho, mientras en AX2 (Fig. 46 6,3X) se observan *streams* teñidos homogéneamente de azul, en las estructuras *padA*⁻ (6,3X) la señal es imperceptible, y sólo a 60X se aprecian células o grupos de células aislados que revelan actividad del "pr1" de *acaA* en el mutante (Fig. 46. A).

Este resultado se corroboró por RT-PCR cuantitativa, donde se cuantificó la expresión del ARNm específico del promotor 1 durante las primeras 11 h del desarrollo en AX2 y *padA*⁻ (Galardi-Castilla *et al.*, 2010).

En la Figura 46. B se pone de manifiesto que el patrón temporal de expresión del "pr1" de *acaA* en el mutante es similar al de AX2, con un pico de expresión máxima a las 6 h, que coincide con el perfil de expresión publicado (Galardi-Castilla *et al.*, 2010). Pero en términos cuantitativos, la expresión es 2,3 veces menor en *padA*⁻ en este punto del desarrollo (6 h). Esta diferencia es muy próxima a la descrita para el transcrito del gen completo en el mismo tiempo del desarrollo (2,28 veces; Fig. 46. B).

De estos resultados no puede concluirse que PadA regule de manera específica la actividad del “pr1” de *acaA*, ya que no se han detectado diferencias significativas entre los niveles de expresión del “pr1” de *acaA* respecto al gen completo en células *padA*⁻. Además, estudios preliminares de la expresión del promotor 2 de *acaA* sobre el ADNc de *padA*⁻, muestran una regulación a la baja mayor que las del “pr1” (no mostrado). Este dato demuestra que PadA regula directa o indirectamente la actividad promotora de *acaA*.

4.3.15.2 Análisis transcripcional de los promotores tempranos de *carA* y *pdsA* en *padA*⁻

Se analizó de forma semi-cuantitativa la expresión de los promotores específicos de la agregación de *carA* y *pdsA* (Louis *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1993), para lo que se diseñaron cebadores específicos (Tabla 1). La expresión en *padA*⁻ de los promotores de la agregación de *carA* y *pdsA* está regulada a la baja (Fig. 46. C) y además, ambos muestran un retraso en el inicio de la expresión de 2 h respecto a AX2. A pesar de no haber realizado una valoración cuantitativa, parece que la regulación a la baja mostrada por ambos promotores tempranos en este ensayo refleja la expresión del transcrito de los genes *carA* y *pdsA* (Fig. 46. A, B).

Estos datos ponen de manifiesto que PadA contribuye al control de la transcripción de los promotores tempranos (específicos de la agregación) de los genes *acaA*, *carA* y *pdsA*, aunque no se descarta su posible función sobre los promotores completos de estos genes.

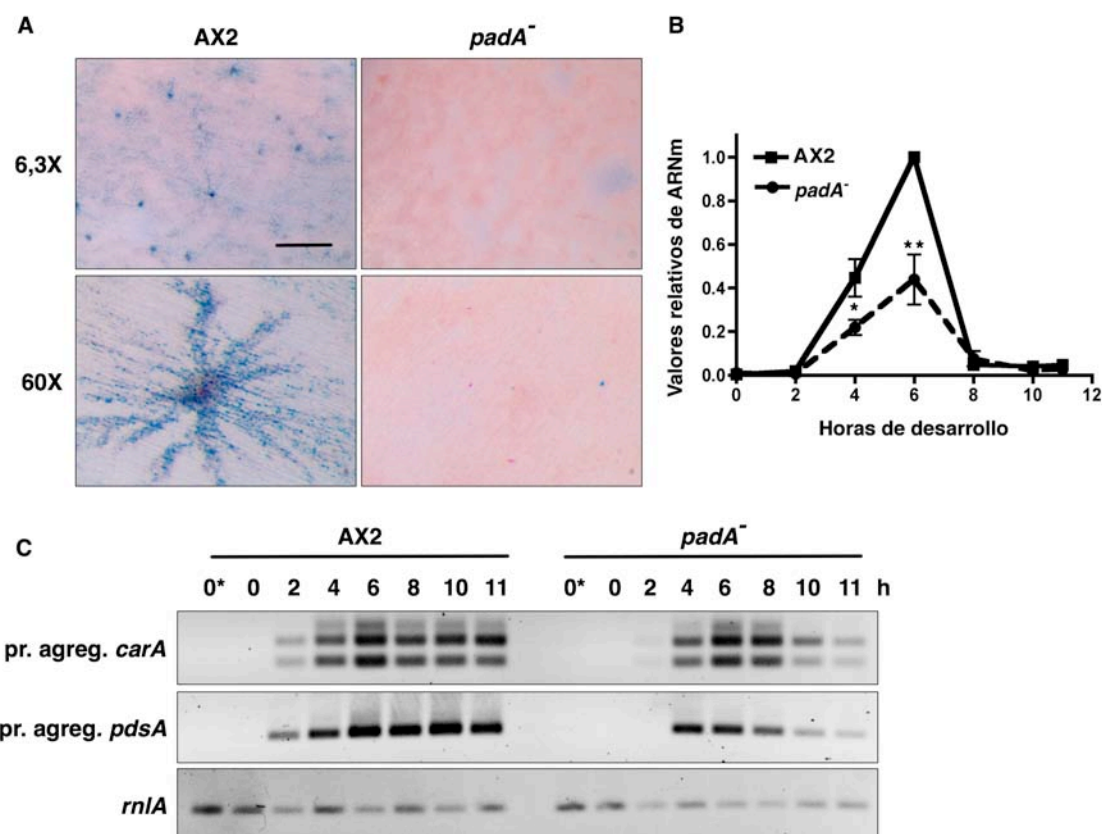


Figura 46. Análisis transcripcional de los promotores de agregación de *acaA*, *pdsA* y *carA* durante el desarrollo temprano. **A)** Actividad del promotor 1 de *acaA* en streams de AX2 y *padA*⁻. Las estructuras se tiñeron posteriormente con eosina para facilitar su visualización, sobre todo de las que no revelaron señal azul. **B)** Cuantificación del transcrito del promotor 1 de *acaA* durante el desarrollo temprano, por RT-PCR cuantitativa. Se representa la media de $n \geq 3 \pm SD$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$. **C)** RT-PCR semi-cuantitativa de los transcritos de los promotores tempranos de *carA* y *pdsA* durante el crecimiento (0 h*) y desarrollo temprano. En B y C se empleó el gen *rnlA* como control de carga.

4.3.16 La generación artificial de pulsos periódicos de AMPc no restaura el defecto en agregación de *padA*⁻

Mutantes como *acaA*⁻, incapaces de sintetizar AMPc, no agregan ni expresan genes esenciales de la agregación como *carA* o *csA* (Pitt *et al.*, 1992; 1993) por su incapacidad de establecer los pulsos de AMPc con la periodicidad e intensidad adecuada, al igual que el mutante *crac*⁻ (Insall *et al.*, 1994b). Este defecto se restaura al mimetizar los pulsos de AMPc externamente; añadiendo concentraciones nanomolares de AMPc cada 6 min a células en agitación (Pitt *et al.*, 1993). Sin embargo, otros mutantes como *carA*⁻, igualmente incapaces de

agregar ni expresar genes tempranos (Soede *et al.*, 1994), no se rescatan con la generación artificial de pulsos nanomolares de AMPc (Soede *et al.*, 1994).

Se analizó si la generación artificial de pulsos de AMPc rescataba el defecto en agregación de *padA*⁻, para lo que se indujo el desarrollo de células AX2 y *padA*⁻ en alta densidad (2×10^7 células/mL) y agitación durante 1 hora. A partir de este momento y durante las siguientes 5 horas, se añadió AMPc (100 nM final) cada 6 minutos de forma manual. Se había preparado un matraz control de cada cepa, en el que en vez de AMPc se añadió QQ2. Tras 5 horas pulsando, se observó la morfología celular, la capacidad de agregación, la expresión de genes tempranos y los niveles de proteína PadA en las células pulsadas y sus controles. El experimento se realizó 5 veces de manera independiente, obteniendo siempre resultados repetitivos.

4.3.16.1 Morfología celular y desarrollo

Una hora después de haber depositado las células pulsadas, en condiciones sumergidas junto a sus controles ($1,5 \times 10^6$ células/mL), se observaron al microscopio (Fig. 47. A). Las células AX2 que han sido pulsadas con AMPc (+AMPc) se muestran alargadas, polarizadas y quimiotácticamente activas, formando *streams* bien definidos (Fig. 47. A). Sin embargo, la morfología de las células *padA*⁻ que han sido pulsadas (+AMPc), no difiere de su control, sin pulsar, ya que están redondeadas y no parecen haber sido estimuladas por el AMPc (Fig. 47. A).

En la Figura 47. B (a y b) se muestra el fenotipo mostrado por las células tratadas (+AMPc) a los 30 min de haberlas depositado sobre agar purificado ($1,5 \times 10^6$ células/mL). En AX2 ya se observan territorios definidos (Fig. 47. B. a), mientras las células *padA*⁻ no muestran signos de agregación (Fig. 47. B. b). Una hora tras el inicio de la agregación, las células AX2 pulsadas forman territorios de agregación perfectamente definidos con largas cadenas de células convergiendo en torno a los centros de agregación (Fig. 47. B. c), mientras las células equivalentes de *padA*⁻ no muestran aún signos de agregación (Fig. 47. B. d). En Figura 47. B (e y f) se muestran AX2 y *padA*⁻ pulsados (+AMPc) en condiciones sumergidas tras 1 hora de agregación, donde se reproduce el fenotipo observado sobre sustrato sólido. A tiempo final, las células *padA*⁻ pulsadas siguen formando centros de agregación pequeños sin evidencias de rescate del fenotipo (no mostrado).

Tras 1 h 45 min de haber depositado las células AX2 pulsadas (+AMPc) sobre agar ultrapuro, éstas comienzan a formar estructuras de desarrollo tipo *mound*, mientras las AX2 sin pulsar

tapizan de manera homogénea el sustrato (Fig. 47. C). Las células *padA*⁻ pulsadas, equivalentes en tiempo de desarrollo, muestran los primeros signos de agregación desorganizada, con centros dispersos en el césped de células (Fig. 47. C).

Como era de esperar, dado el fenotipo en agregación de las células pulsadas, tampoco el retraso en el desarrollo terminal del mutante *padA*⁻ (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008) fue rescatado (Fig. 47. D). A las 17 h de desarrollo las células AX2 (+ AMPc) depositadas sobre filtros de nitrocelulosa ($2,51 \times 10^6$ cells/cm²) han formado cuerpos, frente a las células *padA*⁻ que permanecen en *first finger* y *mexican hat*.

De las observaciones mostradas se concluye que mimetizar los pulsos de AMPc artificialmente sobre *padA*⁻ no rescata su defecto en agregación. Las células *padA*⁻ no responden con la misma intensidad en la polarización, velocidad de agregación o de culminación a como lo hace el silvestre.

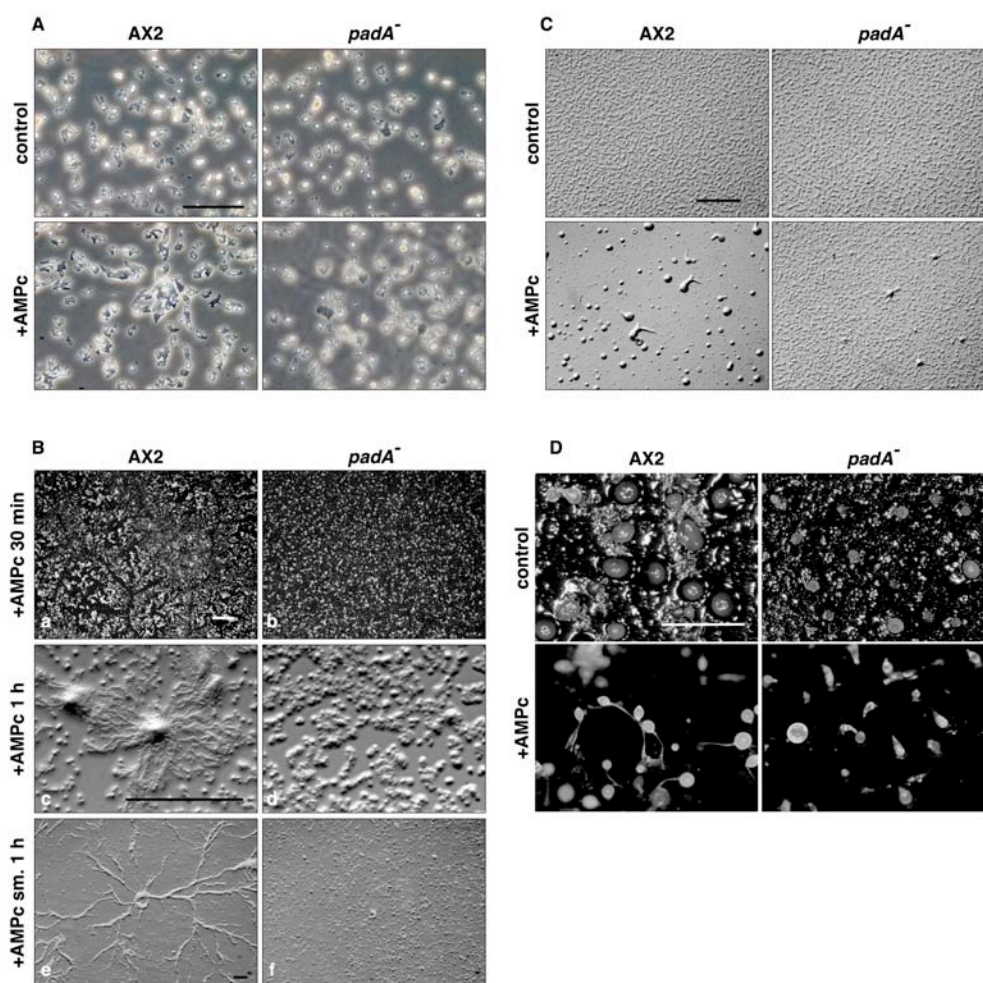


Figura 47. La generación de pulsos exógenos de AMPc no rescata el fenotipo de *padA⁻*. **A)** Morfología de las células control y pulsadas de *AX2* y *padA⁻* 1 h después de depositarlas en condiciones sumergidas ($1,5 \times 10^6$ células/mL). Fotografías tomadas en microscopio de contraste de fase. Barra: 0,1 mm. **B)** Morfología del proceso de agregación sobre agar (a, b, c, e) y sumergido (e, f) 30 min y 1 h después de depositar las células pulsadas. Barra: 1 mm. **C)** Estado de la agregación de células *AX2* y *padA⁻* pulsadas y sin pulsar sobre agar 1 h 45 min después. **D)** 17 h de desarrollo de células pulsadas y control sobre filtros de nitrocelulosa ($2,51 \times 10^6$ cells/cm²). Barra: 1 mm.

4.3.16.2 Los pulsos de AMPc no restauran la expresión de *acaA*, *carA*, *pdsA* y *pdiA* a niveles silvestres en *padA⁻*

Se analizó el nivel de inducción a tiempo final de los genes inducibles por AMPc *acaA*, *pdsA*, *carA* y *pdiA* (este último como control) para comprobar si se restablecen los niveles silvestres de transcripción.

Se extrajo ARN total de las células AX2 y *padA*⁻ tras las 6 horas de pulsos con AMPc, y también de sus controles. El ADNc obtenido a partir de la retrotranscripción del ARN, se empleó para cuantificar el nivel de expresión de *acaA*, *pdsA*, *carA* y *pdiA* por RT-PCR semi-cuantitativa y RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

En la Figura 48. A se muestra el resultado del análisis de expresión por RT-PCR semi-cuantitativa de *acaA*, *pdsA*, *carA* y *pdiA* en las células pulsadas y sus controles a tiempo final. Se observa que ninguno de los tres genes inducibles por AMPc (*acaA*, *pdsA*, *carA*) alcanza los niveles silvestres de expresión tras el tratamiento con pulsos de AMPc en *padA*⁻, sin embargo *pdiA*, represible por AMP, se comporta de igual manera en *padA*⁻ que en AX2.

Estos resultados se corroboran en el estudio cuantitativo de la expresión, por RT-PCR cuantitativa en tiempo real y cuyos resultados se muestran en la Figura 48. B. La cuantificación de estos experimentos, siempre teniendo en cuenta que no está necesariamente cuantificado el punto de máxima inducción, pone de manifiesto que en el mutante *padA*⁻ no se alcanzan los niveles máximos de expresión del tipo silvestre. Se ha tomado siempre como referencia el valor de expresión de AX2 sin pulsar (al que se le asigna el valor 1). *acaA* alcanza niveles máximos de expresión 1,7-2,4 veces inferiores a los de AX2. *carA*, por su parte alcanza niveles máximos 2,2-2,6 veces inferiores al silvestre, y *pdsA*, niveles 2,17-3,9 veces menores que AX2.

También se compararon los valores de inducción propiamente dichos, es decir, la diferencia del nivel de expresión entre pulsado y control de la misma cepa. En el caso de *carA*, como en *padA*⁻ parte de unos niveles de expresión inferiores a los de AX2, la inducción es similar a la de AX2, sólo 1,4-1,5 veces inferior. *acaA* se induce 2,15-2,2 veces menos en *padA*⁻, y *pdsA* lo hace 1,3-2,25 veces menos que AX2 (Fig. 48. B).

Estos datos revelan que las células *padA*⁻ no restauran los niveles de expresión de los genes del relé del AMPc en respuesta a la mimetización de los pulsos de AMPc extracelular.

También se cuantificó el nivel de expresión e inducción del gen de adhesión *cadA* en células *padA*⁻ pulsadas. *cadA*, es también inducible por AMPc (Yang *et al.*, 1997) y en *padA*⁻ está regulado a la baja durante el crecimiento (tanto en HL5 como en MM) y el desarrollo (Tabla 7 y Fig. 43). Las células *padA*⁻ sí recuperan niveles silvestres de expresión en las células pulsadas (Fig 48. C), de hecho *padA*⁻ alcanza un mayor nivel de expresión respecto a AX2 ($7,75 \pm 2,1$ frente a $4,7 \pm 0,4$ de AX2). Si comparamos la inducción de *cadA*, también tiende a

ser superior respecto a la de AX2 ($5,66 \pm 1,1$ frente a $4,7 \pm 0,4$ de AX2). Este resultado podría deberse al hecho de que concentrar las células es suficiente para elevar los valores de expresión de *cadA* en *padA*⁻, tanto, que incluso superan los valores de AX2 en condiciones sin pulsar (Fig. 48. C).

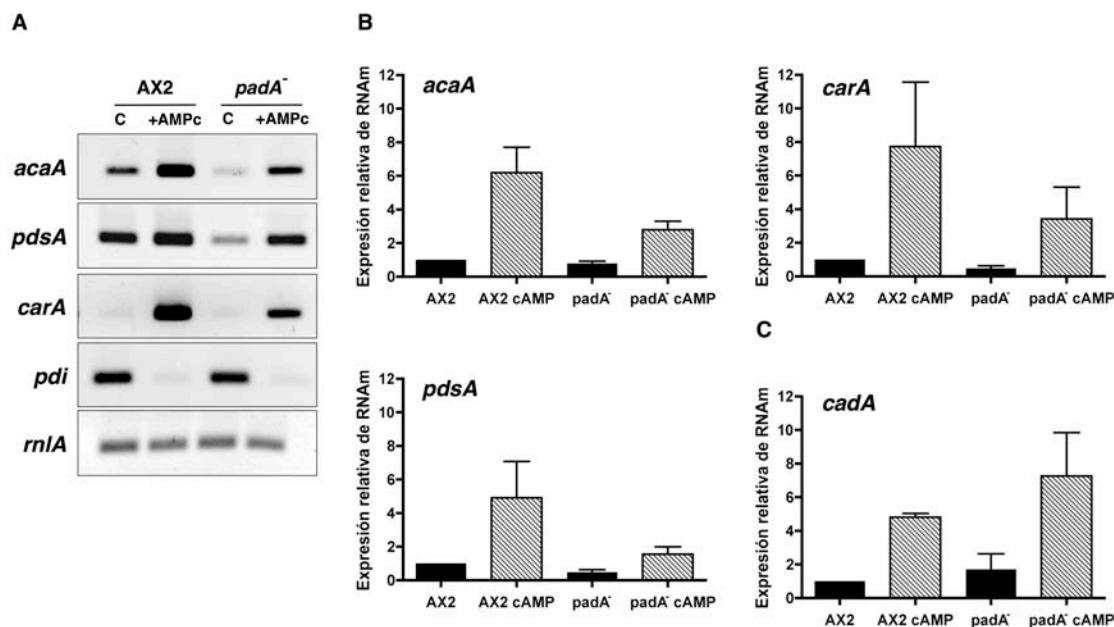


Figura 48. Los pulsos exógenos de AMPc no restauran los niveles silvestres de expresión de los genes del relé del AMPc en *padA*⁻. **A)** RT-PCR semi-cuantitativa de la expresión de *acaA*, *pdsA*, *carA* y *pdiA* en células pulsadas respecto a su control sin pulsar. El ARNm se extrajo inmediatamente tras las 6 h de pulsos. **B)** Cuantificación de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. **C)** *cadA* sí alcanza niveles silvestres de expresión tras los pulsos, y también en el control a alta densidad. Todos los valores se normalizaron frente al valor de expresión de AX2 no pulsado. Se representa la media de $n \geq 3 \pm$ SEM (error estándar de la media).

4.3.16.3 El tratamiento con pulsos de AMPc no induce translocación nuclear de la proteína PadA

El homólogo en humanos de NmrA, NMRAL1 (HSCARG) es capaz de translocarse al núcleo de las células en respuesta a DHEA, un análogo de la dehidroepiandrosterona que inhibe la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y altera el ratio NADPH/NADP⁺. Los datos obtenidos sugieren que PadA es necesario para la correcta inducción por AMPc de, por lo menos, *acaA*, *pdsA* y *carA*. Su función como corregulador transcripcional puede estar mediada por su translocación al núcleo, por lo que se analizó, por *western blot*, si la presencia de AMPc (utilizando las células pulsadas) alteraba la localización subcelular de PadA.

Se prepararon extractos proteicos fraccionados a partir de células silvestres (AX2) control y pulsadas (+AMPc). El fraccionamiento se llevó a cabo mediante lisis en tampón con detergentes y centrifugaciones diferenciales para separar el contenido citoplasmático del nuclear. Como control de proteína total se lisó el mismo número de células en tampón de carga. Los extractos se separaron y analizaron por *western blot* y se revelaron con el anticuerpo policlonal α PadA. La misma membrana se re-hibridó con anti- α Tubulina para corregir la carga y comprobar la pureza de los extractos nucleares. En la Figura 49 se observa que la proteína PadA no parece estar más representada en los extractos pulsados ni se observa una translocación nuclear de la misma tras el tratamiento con AMPc. Se aprecia una ligera señal en el carril correspondiente a la fracción nuclear de células pulsadas, pero una vez corregida la carga por densitometría con una banda inespecífica (no mostrado), se comprobó que no existen diferencias significativas entre la localización subcelular de PadA en las dos condiciones. Aunque aquí se muestra un resultado representativo, el experimento se repitió dos veces más con idénticos resultados.

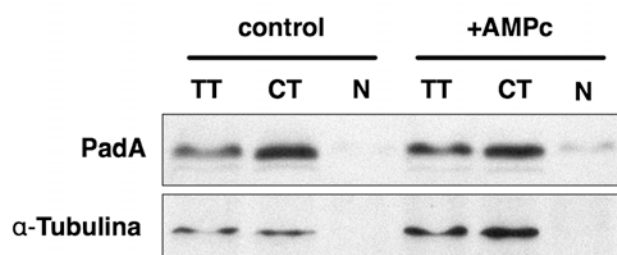


Figura 49. Western blot de extractos fraccionados de AX2, para detectar una posible translocación nuclear de PadA en las células pulsadas. Se cargaron cantidades equivalentes de los extractos. La ausencia de señal de la tubulina en el extracto nuclear (N) certifica que son extractos nucleares. (TT: extracto total, lisado en tampón de carga directamente. CT: fracción citoplásmica. N: fracción nuclear).

4.3.17 La señalización mediada por GMPc no está alterada en *padA*⁻

Los defectos de *padA*⁻ en la señalización del AMPc, (la síntesis de GMPc se induce, entre otros, por la unión del AMPc a CarA) unidos al retraso en la polarización celular observado en las células mutantes sometidas a pulsos de AMPc plantearon la posibilidad de que la señalización del GMPc estuviera afectada. A pesar de que *padA*⁻ no parece presentar defectos en movilidad (I. Serafimidis y T. Suárez, comunicación personal), la alteración en la

señalización del GMPc puede originar procesos anormales de agregación (Ross y Newell, 1981; Van Haastert *et al.*, 1982).

A partir del ARNm del desarrollo temprano (0-11 h), se analizó el patrón de expresión temprano de la guanilato ciclasa transmembrana (*gcA*), y la fosfodiesterasa específica de GMPc (*pdeD*), por RT-PCR semi-cuantitativa. El nivel de expresión de ninguno de los dos genes analizados está significativamente alterado en el mutante *padA*⁻, ni tampoco su patrón temporal de expresión (Fig. 50).

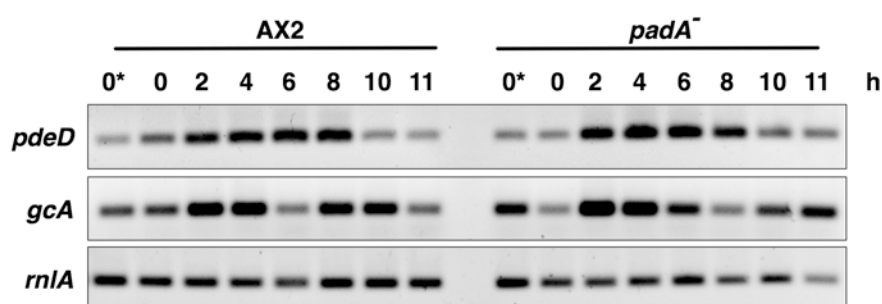


Figura 50. Niveles de expresión de *gcA* y *pdeD* durante el desarrollo temprano de AX2 y *padA*⁻. Se analizó la transcripción de los genes durante las 11 primeras horas del desarrollo por RT-PCR semi-cuantitativa. Se muestra un experimento representativo. El gen *rnlA* se empleó como control de carga.

4.3.18 La expresión constitutiva de *carA* rescata el fenotipo en agregación de *padA*⁻

4.3.18.1 La expresión constitutiva de *carA* rescata el número y el tamaño de los territorios en *padA*⁻

Todos los datos obtenidos hasta el momento apuntaban a que el relé del AMPc estaba afectado en *padA*⁻. El problema residía en identificar el origen del defecto, ya que la expresión de *acaA*, *pdsA* y *carA* forma un circuito cerrado; de manera que un defecto en uno de sus componentes se refleja en todos y cada uno de ellos (Loomis *et al.*, 2008). Hemos intentado rescatar el fenotipo mutante con la sobreexpresión de uno de sus componentes, hecho que nos daría una valiosa información sobre el origen del defecto de *padA*⁻. A diferencia del fenotipo de *carA*⁻ (Soede *et al.*, 1994) su sobreexpresión no da lugar a un fenotipo dramático en agregación, según Johnson y colaboradores (1991), y se manifiesta únicamente con un retraso de 1-3 horas en el inicio de la agregación. Estas células sobre-expresoras

AX2/A15::*carA* expresan entre 3 y 5 veces el número de receptores del tipo silvestre y presentan la misma afinidad por el AMPc que los receptores nativos (Johnson *et al.*, 1991). Por el contrario, la sobreexpresión de *pdsA* anula la agregación y el desarrollo (Faure *et al.*, 1988). También se ha documentado que la sobreexpresión de *acaA* en AX2 da lugar a agregados más pequeños y numerosos, además del aumento hasta 25 veces en la actividad adenilato ciclasa *in vitro* respecto al silvestre (Pitt *et al.*, 1992).

Se transfectaron las células AX2 y *padA*⁻ con vectores que expresaban *acaA* y *carA* bajo el promotor constitutivo Actina 15. Teniendo en cuenta que *padA*⁻ no se rescata con los pulsos de AMPc, no era de esperar que lo hiciera con la sobreexpresión de *acaA*. Sin embargo con la expresión constitutiva de *carA* era más plausible la recuperación, ya que el nulo de *carA* (*carA*⁻) tampoco se rescata con pulsos de AMPc, debido a la ausencia de receptor para transducir la señal del AMPc añadido (Soede *et al.*, 1994).

Una vez seleccionados los transfectantes (sin valorar el número de copias del inserto presentes en los mismos), se sometieron a ayuno y a ensayos de agregación sobre agar ultrapuro ($2,5 \times 10^5$ cells/cm²).

Como se observa en la Figura 51. A, a las 10,5 h del desarrollo la sobreexpresión de *acaA* modifica el tamaño y forma de los territorios de AX2, haciéndolos más pequeños y compactos en este inicio del desarrollo, tal y como estaba descrito (Pitt *et al.*, 1992) pero no se observa una aceleración clara del proceso. Sin embargo, no modifica ni el tamaño de los agregados ni el curso temporal de la agregación en *padA*⁻.

La expresión constitutiva de *carA* acelera la formación de territorios definidos en AX2, a diferencia de lo publicado (Johnson *et al.*, 1991) (Fig. 51.B. Fotografías tomadas a las 10 h del desarrollo). Este mismo adelanto respecto al control sin transfectar, se observa en *padA*⁻/A15::*carA* (Fig. 51. B). A diferencia de *acaA*, la sobreexpresión del receptor *carA* no modifica la morfología de los centros de agregación en AX2, pero sí en *padA*⁻, donde rescata el fenotipo mutante. Este rescate se ve mucho más claro a las 11 h del desarrollo (Fig. 51. C), cuando las células *padA*⁻/A15::*carA* consiguen formar territorios de tamaño silvestre, con *streams* largos y bien definidos. En esta misma figura se observa que la sobreexpresión de *acaA* no rescata el fenotipo del mutante en absoluto, y como se vislumbraba a tiempos más tempranos, modifica el tamaño de los centros de agregación del silvestre.

El rescate en la agregación de *padA*⁻ mediante la expresión constitutiva de *carA* también se observó en condiciones sumergidas a las 12 h (Fig. 51. D). Incluso el proceso de culminación, en el que *padA*⁻ está retrasado (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008) se rescata con la sobreexpresión de *carA* (no mostrado).

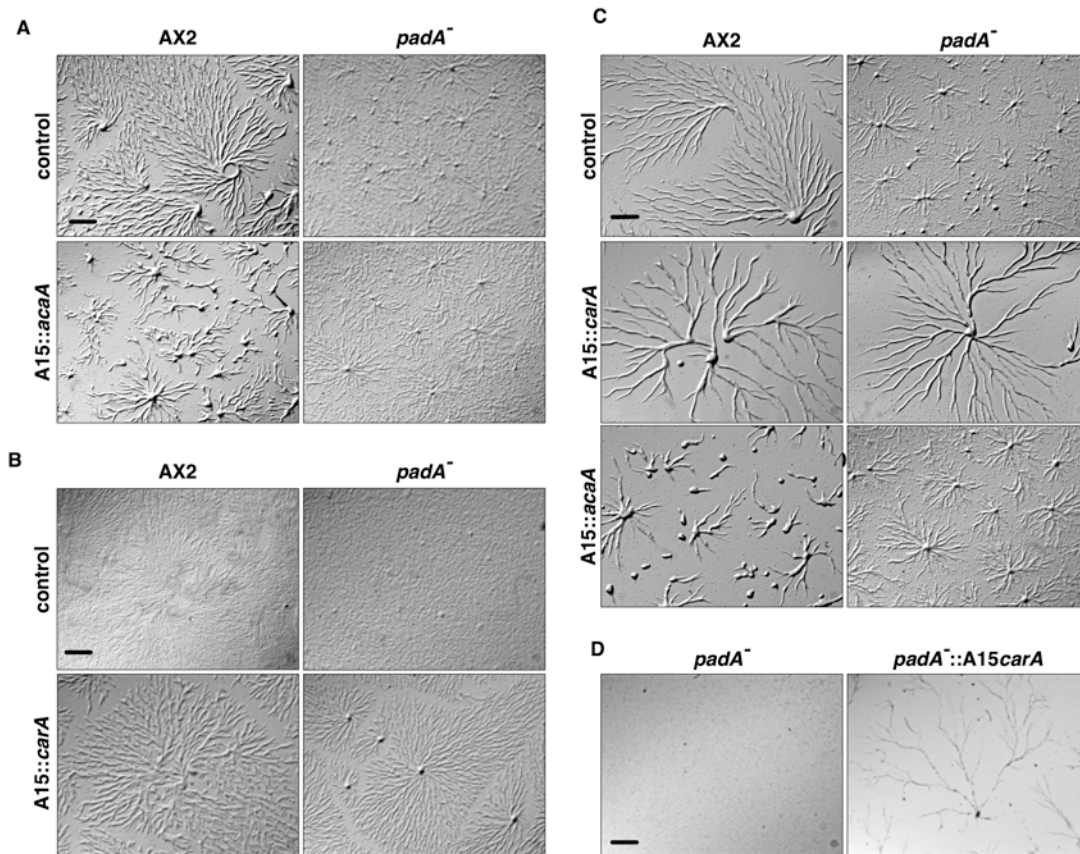


Figura 51. La expresión constitutiva de *carA* rescata el número y el tamaño de los territorios en *padA*⁻. A) Agregación sobre agar de células AX2 y *padA*⁻ que expresan A15::*acaA* a las 10,5 h. B) Agregación sobre agar de células que expresan A15::*carA* a las 10 h. C) Centros de agregación formados por AX2 y *padA*⁻ que expresan constitutivamente *acaA* y *carA* a las 11 h del desarrollo sobre agar. D) Desarrollo de *padA*⁻/A15::*carA* en condiciones sumergidas a las 12 h. Barra: 1 mm.

4.3.18.2 La actividad fosfodiesterasa en *padA*⁻/A15::*carA* está parcialmente rescatada

Los resultados mostrados sugieren que el receptor de AMPc, CarA, es limitante en el mutante *padA*⁻ durante la agregación. Para caracterizar con detalle la restauración del fenotipo en la cepa *padA*⁻/A15::*carA* se valoró su actividad fosfodiesterasa *in vivo*. En la Figura 52, se observa (a dos aumentos distintos), que las células *padA*⁻/A15::*carA* presentan una

actividad fosfodiesterasa ligeramente menor que la del silvestre pero mayor que la del mutante, ya que sobre un sustrato con 300 nM de AMPc, las células de la cepa *padA*⁻/A15::*carA* migran una distancia mayor que la de *padA*⁻ pero sin alcanzar la de AX2. En presencia de 0,25 mM DTT, (además de 300 nM AMPc), que, como se había descrito en el apartado 4. 3. 9. (Fig. 39) anula la actividad fosfodiesterasa en *padA*⁻, las células *padA*⁻/A15::*carA* también muestran un nivel de actividad intermedio, menor que el del silvestre. Las imágenes fueron tomadas a las 3 horas desde que se depositaron las células sobre el agar. A las 17 horas, es posible observar que incluso con 0,5 mM de DTT, las células de AX2 y de *padA*⁻/A15::*carA* se han movido ligeramente alrededor de la gota, mientras que las de *padA*⁻ no se mueven (Fig. 52). Esto pone de manifiesto el fenotipo intermedio en cuanto a actividad fosfodiesterasa de la cepa rescatada. Se obtuvo el mismo resultado en el ensayo de quimiotaxis al que se sometió a *padA*⁻/A15::*carA*, que responde a un rango más amplio de AMPc, pero no se comporta de manera silvestre (no mostrado).

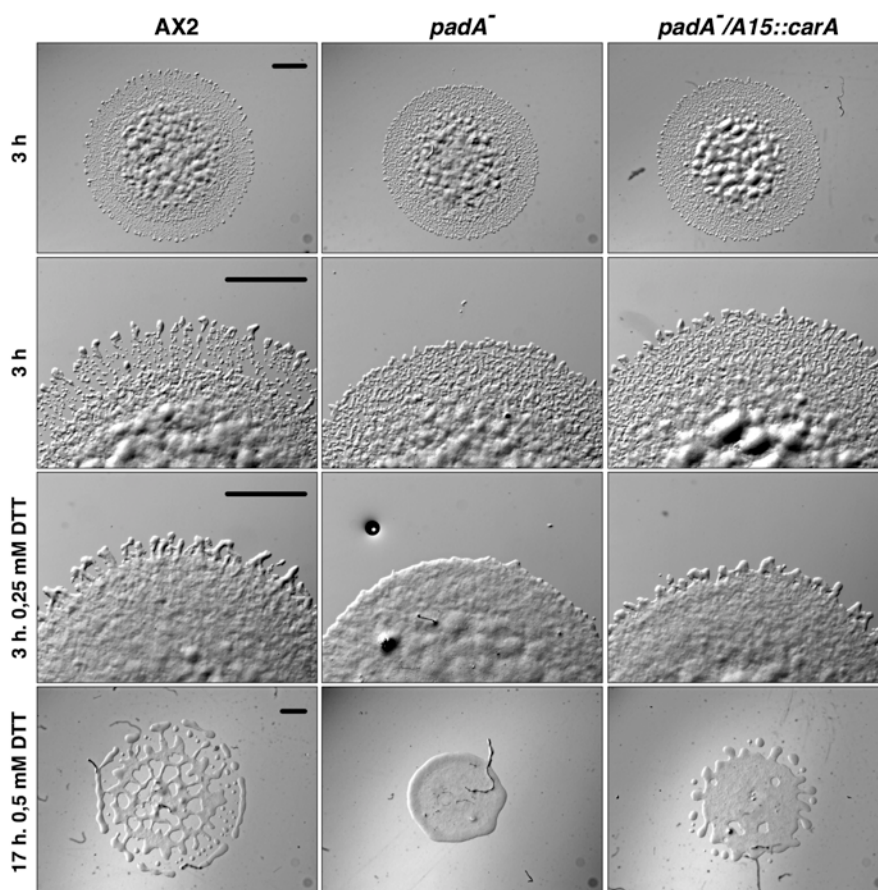


Figura 52. Actividad fosfodiesterasa *in vivo* de *padA*⁻/A15::*carA* respecto a la de AX2 y *padA*⁻. Patrón de migración de las células sobre un sustrato de agar con 300 nM de AMPc. En las filas 2, 3 y 4 también se añadió DTT. Fotografías tomadas a las 3 h tras depositar las células; fila 4; a las 17 h. Barra: 1 mm.

4.3.18.3 Análisis transcripcional en *padA*⁻/A15::*carA*

Se analizó el nivel de expresión de los genes del relé *acaA*, *carA* y *pdsA* en la cepa *padA*⁻/A15::*carA* durante el inicio del desarrollo (0-10 h). Sin embargo, para *carA* no se pudo analizar la expresión del gen, porque se trata de una expresión constitutiva y no nos aportaría información alguna, pero sí pudimos analizar la regulación del promotor residente de la agregación (Louis *et al.*, 1993).

En la Figura 53 se observa que la expresión de los tres genes, *acaA*, *pdsA* y el promotor temprano de *carA*, está regulada en *padA*⁻/A15::*carA*. Además se aprecia que el nivel de expresión de *acaA* y de *pdsA* en *padA*⁻/A15::*carA* es más elevado que en el mutante *padA*⁻ (Fig. 53).

El patrón de expresión del promotor temprano de *carA* en *padA*⁻/A15::*carA* está regulado, pero su nivel de expresión en todos los tiempos analizados, excepto en 6 h, es menor que en la cepa mutante *padA*⁻, lo que podría indicar que la expresión del promotor temprano no está rescatada en la cepa *padA*⁻/A15::*carA* (Fig. 53).

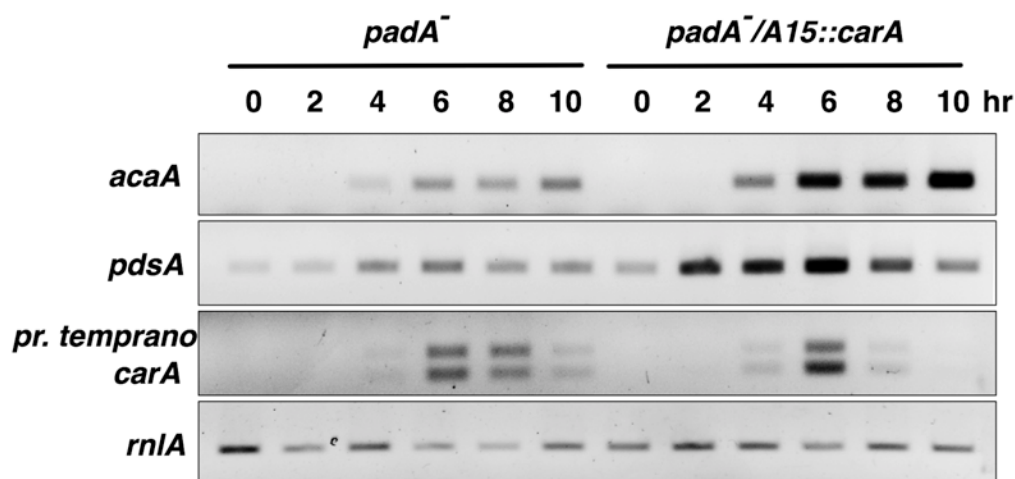


Figura 53. La expresión constitutiva de *carA* aumenta los niveles de ARNm de *acaA* y *pdsA*. RT-PCR semi-cuantitativa a partir del ARNm del desarrollo temprano (0-10 h) obtenido de la cepa *padA*⁻/A15::*carA* en comparación con *padA*⁻. Se muestra un experimento representativo. El gen *rnlA* se empleó como control de carga.

Para comprobar si otros genes que están regulados a la baja en *padA*⁻ recuperaban, o al menos aumentaban, su nivel de expresión en *padA*⁻/A15::*carA*, se analizó la expresión de *cadA*, *csA*, *gpaB*, *glk* y *yakA*. Los genes de adhesión *cadA* y *csA* presentan un nivel de expresión

ligeramente mayor en la cepa que sobreexpresa *carA* respecto a los de *padA*⁻; al igual que los niveles de *gpaB*, la subunidad Gα2 de la proteína G acoplada a CarA. Sin embargo, *yakA*, quinasa del GDT que activa la PKA, no aumenta su cantidad de transcrito en *padA*⁻/A15::*carA*, como tampoco lo hace *glk* (glucoquinasa). Con este resultado se concluye que los genes inducibles por AMPc que se han analizado aumentan su nivel de expresión en la cepa *padA*⁻/A15::*carA*. Genes independientes al relé, como *glk* o *yakA* (aguas arriba de *carA*, *pdsA* y *acaA* en el GDT), no recuperan ni aumentan su nivel de expresión.

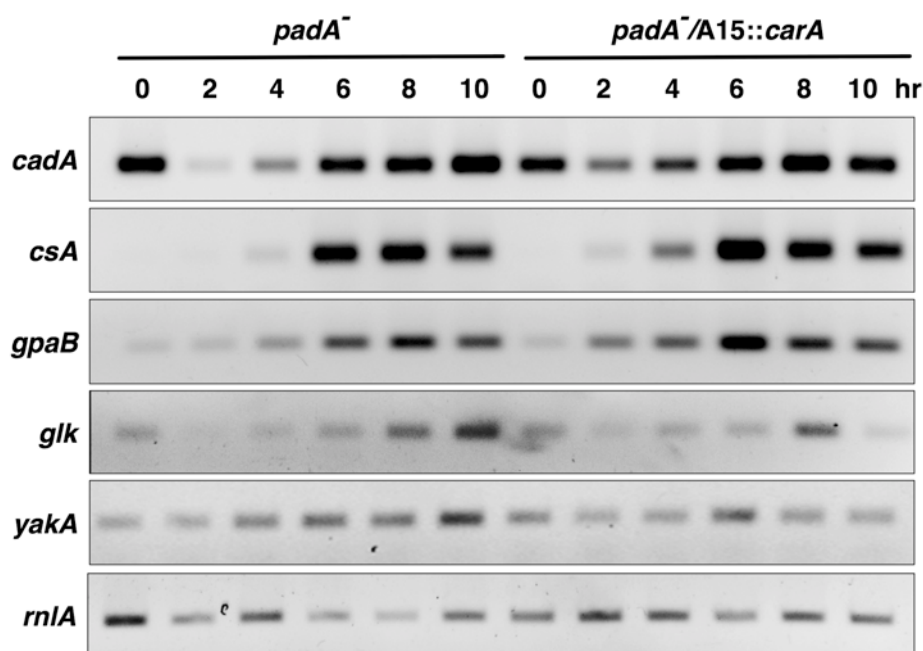


Figura 54. Aumento de la expresión de los genes aguas abajo de *carA* en *padA*⁻/A15::*carA*. Nivel de expresión por RT-PCR semi-cuantitativa de algunos genes regulados a la baja en *padA*⁻ en comparación con los niveles de ARNm de *padA*⁻/A15::*carA*. Se muestra un experimento representativo del inicio del desarrollo (0-10 h).

Los resultados de este apartado indican que el receptor del AMPc CarA es limitante durante la agregación para *padA*⁻. Además, la presencia de CarA en alto número de copias también rescata el retraso en la culminación del mutante *padA*⁻. El rescate de la agregación mediada por CarA podría ser el resultado de la restauración/aumento de los niveles de ARNm de *acaA* y *pdsA*. Sin embargo, el nivel de expresión del promotor nativo *carA* no está rescatado, lo que sugiere una posible regulación directa o indirecta de este promotor por PadA.

4.3.19 La actividad promotora *acaA* y *pdsA* (tardío) está desregulada en los slugs de *padA*⁻

La restauración de la culminación, tanto temporal como morfológica de *padA*⁻/A15::*carA*, centra el defecto de *padA*⁻ durante el desarrollo en el relé del AMPc. Considerando el fenotipo *slugger* descrito para *padA*⁻ durante el desarrollo, y su retraso en la decisión de culminar (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008), se analizó la actividad promotora de dos genes esenciales del relé del AMPc, también indispensables en el desarrollo tardío: *acaA* y *pdsA*. Concretamente se analizó el transcrito tardío de *pdsA*, específico de células pre-tallo y esencial durante la culminación y morfogénesis (Faure *et al.*, 1990; Traynor *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1995) y la región promotora de *acaA* activa en el *tip* (Verkerke Van-Wijkt *et al.*, 2001) cuya actividad regula la activación de los factores de transcripción necesarios para la expresión de genes que llevan a la culminación (Fukuzawa *et al.*, 1997; Fukuzawa y Williams, 2000; Mohanty *et al.*, 1999; Wang y Williams, 2010).

Se transformaron células AX2 y *padA*⁻ con vectores que contienen las regiones promotoras descritas fusionadas a β -galactosidasa y con las células transformadas se obtuvieron estructuras del desarrollo en estadio de *slug*, que se fijaron y revelaron. Como se observa en la Figura 55. A, la actividad de ambos promotores está desregulada y deslocalizada en el *slug* de *padA*⁻ respecto al de AX2, que muestra la tinción azul en las regiones descritas; el *tip* para *acaA* y la región *pstO* para *pdsA* tardío o “late”. La desregulación en la expresión de *acaA* y *pdsA* durante la fase de *slug* se ha confirmado por hibridación *in situ* para ambos genes, como se observa en la Figura 55. B.

La desregulación y deslocalización en la expresión de *acaA* y *pdsA* en los *slugs* podría ser el resultado del incorrecto establecimiento del relé del AMPc desde el *tip* de las babosas, que se refleja en un fenotipo *slugger* y retraso en la culminación (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008).

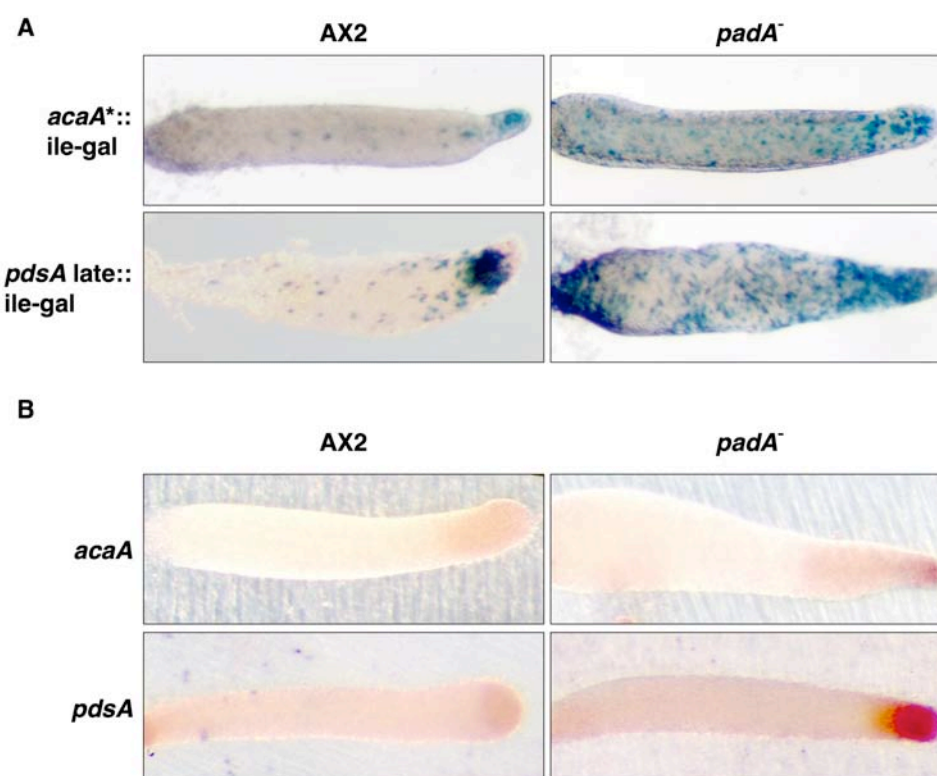


Figura 55. Patrón de expresión de *acaA* y *pdsA* en *slugs* de AX2 y *padA*⁻. **A)** Actividad promotora de *acaA* y *pdsA* tardío revelada con X-gal. **B)** Hibridación *in situ* de *acaA* y *pdsA* sobre *slugs* de AX2 y *padA*⁻.

4.4 VALIDACIÓN DEL MODELO ESTRUCTURAL DE PADA

4.4.1 Las proteínas mutantes PadAH178A/D179N y PadAT18V se expresan en el fondo *padA*⁻

La funcionalidad de los dominios de unión a NAD(H)⁺/NADP(H)⁺ y de interacción con factores GATA de la proteína PadA se demostró, en primer lugar, comprobando que la sobreexpresión de las proteínas portadoras de mutaciones puntuales en los residuos conservados de estos dominios no complementaba el fenotipo mutante *padA*⁻ en culminación (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008; y tesis, 2008). La falta de complementación, sin embargo, podría deberse a la ausencia de la proteína, si las proteínas mutantes fueran inestables y se degradaran, como ocurre con la proteína truncada PadAD276. En la Figura 56 se observa que tanto la proteína mutada en el posible sitio de interacción con factores GATA, PadAH178A/D179N, como la portadora de la mutación en el sitio de unión a cofactor, PadAT18V, se expresan, revelando una banda del tamaño esperado (≈ 33 kDa). A pesar de

que en estas cepas no se observa el patrón de degradación existente en la proteína PadAD276 (Fig. 16), es necesario cargar 30 μg de proteína para poder visualizarla por *western blot*, mientras que 0,6 μg son suficientes para visualizar PadA (sobreexpresión de la proteína silvestre). Esto indica que las proteínas mutantes son más inestables que la silvestre, aunque su nivel de expresión debería ser suficiente para complementar el fenotipo, y aún así no lo hacen. Por lo tanto, este resultado valida el modelo estructural propuesto (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Es reseñable que la señal de la proteína en la cepa *padA*⁻/A15::*padAT18V* (cofactor) es más débil que la detectada para *padA*⁻/A15::*padAH178A/D179N* (unión con factores GATA) (Fig. 56).

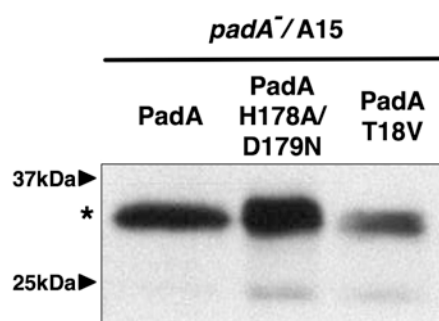


Figura 56. PadAT18V y PadAH178A/D179N se expresan en el fondo genético *padA*⁻. *Western blot* con 30 μg de *padA*⁻ expresando de manera constitutiva las proteínas mutadas en los sitios esenciales de unión a NAD(H)⁺/NADP(H)⁺ y de interacción con factores GATA. En el carril izquierdo, 0,6 μg de extracto de *padA*⁻ expresando constitutivamente la proteína PadA.

4.4.2 *padA*⁻/A15::*padAT18V* y *padA*⁻/A15::*padAH178A/D179N* no rescatan el defecto en crecimiento de *padA*⁻

La cepa *padA*⁻/A15::*padAT18V* es portadora de una mutación en el sitio conservado de unión a cofactor (NAD(H)⁺/NADP(H)⁺) (Lamb *et al.*, 2004; Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). El tiempo de duplicación de esta cepa en medio HL5 es de $13,7 \pm 2,7$ h, similar al de *padA*⁻, y en medio mínimo, la mutación es letal (Fig. 57), mientras la sobreexpresión de la proteína completa, *padA*⁻/A15::*padA*, impide el crecimiento pero no es letal.

El mutante *padA*⁻/A15::*padAH178A/D179N* porta dos mutaciones puntuales en el sitio conservado de interacción con factores tipo GATA (Stammers *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2004; Núñez-Corcuera, 2008). Su tiempo de duplicación en medio HL5 es de $11,9 \pm 1,9$ h, crece ligeramente más despacio que el silvestre pero más rápido que *padA*⁻. En medio mínimo tiene

un tiempo de duplicación de $36,6 \pm 14$ h (Fig. 57.), crece muy despacio pero mejor que *padA*⁻ en este mismo medio ($44,6 \pm 16$ h; Fig. 22).

Estos datos demuestran que la expresión de las proteínas mutantes no rescata la velocidad de crecimiento de *padA*⁻, aunque la expresión de PadAH178A/D179N la mejora ligeramente. Es interesante destacar que la expresión de PadAT18V es tóxica en medio mínimo (Fig. 57).

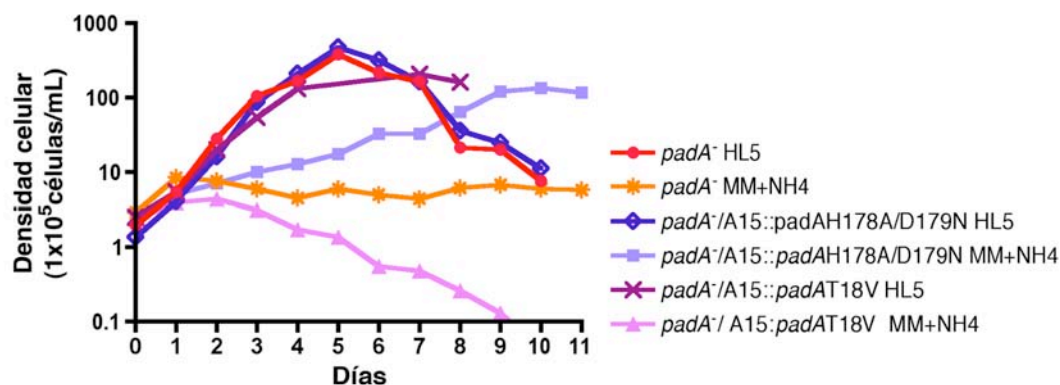


Figura 57. Curva de crecimiento de las cepas *padA*⁻/A15::*padAH178A/D179N* y *padA*⁻/A15::*padAT18V* en HL5 y MM. Las células en medio mínimo habían crecido previamente en medio rico y se transfirieron a medio mínimo con 53,5 mg/L NH₄Cl. Se inocularon a una densidad de $1,5-2,5 \times 10^5$ células/mL y se midió la concentración celular cada 24 h durante 11 días con un hemocitómetro. Se muestra un experimento representativo.

4.4.3 La expresión de las proteínas PadAH178A/D179N y PadAT18V no restaura el defecto de *padA*⁻ durante la agregación ni la culminación

Células en ayuno de las cepas *padA*⁻ que expresan las proteínas mutantes PadAH178A/D179N y PadAT18V se depositaron sobre agar para observar si el desarrollo y, en particular, el proceso de agregación estaba restaurado. Como se observa en la Figura 58, a las 10 h, la expresión constitutiva de *padA* (*padA*⁻/A15::*padA*) da lugar a agregados aún más pequeños que los formados por *padA*⁻ y el fenotipo no está totalmente restaurado, aunque sí se rescata el defecto en la culminación (Núñez-Corcuera *et al.* 2008). La expresión constitutiva de PadAD276 en el fondo mutante no afecta a la agregación (Fig. 58). La expresión de las proteínas PadAT18V y PadAH178A/D179N en el fondo *padA*⁻, da lugar a fenotipos radicalmente diferentes en agregación. A las 10 h, *padA*⁻/A15::*padAH178A/D179N* forma territorios similares en tamaño a *padA*⁻ (Fig. 58) pero recluta más células que *padA*⁻ y por lo tanto quedan menos células “sueltas” que no entran a formar parte de los centros de

agregación. *padA*·/A15::*padAT18V*, por el contrario, tiene un defecto muy dramático en la agregación, y a las 10 h aún no ha conseguido formar ningún centro (Fig. 58).

Es interesante advertir que la presencia en gran cantidad de la proteína silvestre PadA o de la forma mutante PadAT18V impide el crecimiento en medio mínimo, e interfiere con la agregación, en mayor o menos grado (Fig. 57).

A las 14,5 h, todas las cepas están retrasadas respecto al silvestre, que ya ha formado *first fingers* *padA*· y *padA*·/A15::*padAD276* han formado *mounds* más pequeños que los que se observan en *padA*·/A15::*padAH178A/D179N* (mutación en sitio GATA). A las 21 h, se observa que *padA*·/A15::*padA* y AX2 forman *slugs* migradores, mientras *padA*·/A15::*padAH178A/D179N* muestra *mounds* atípicos con algunos *first finger* sobre ellos, y *padA*·, *padA*·/A15::*padAD276* y *padA*·/A15::*padAT18V* han formado *mounds* morfológicamente muy similares entre ellos, aunque esta última cepa está más retrasada, e incluso presenta algunos *streams* sin cerrarse (no mostrado). A las 48 h, AX2, *padA*· y *padA*·/A15::*PadAD276* han culminado y las dos últimas forman cuerpos fructíferos más pequeños y retorcidos que los de AX2 (Fig. 58). El exceso de proteína PadA (*padA*·/A15::*padA*) hace que los cuerpos sean también más pequeños y más numerosos. *padA*·/A15::*padAH178A/D179N*, sigue bloqueado en el estadio de *mound* y no progresa, aunque se observa algún cuerpo aberrante ya culminado. De nuevo, *padA*·/A15::*padAT18V* muestra el fenotipo más dramático, con la mayoría de las células paralizadas en *streams* (Fig. 58).

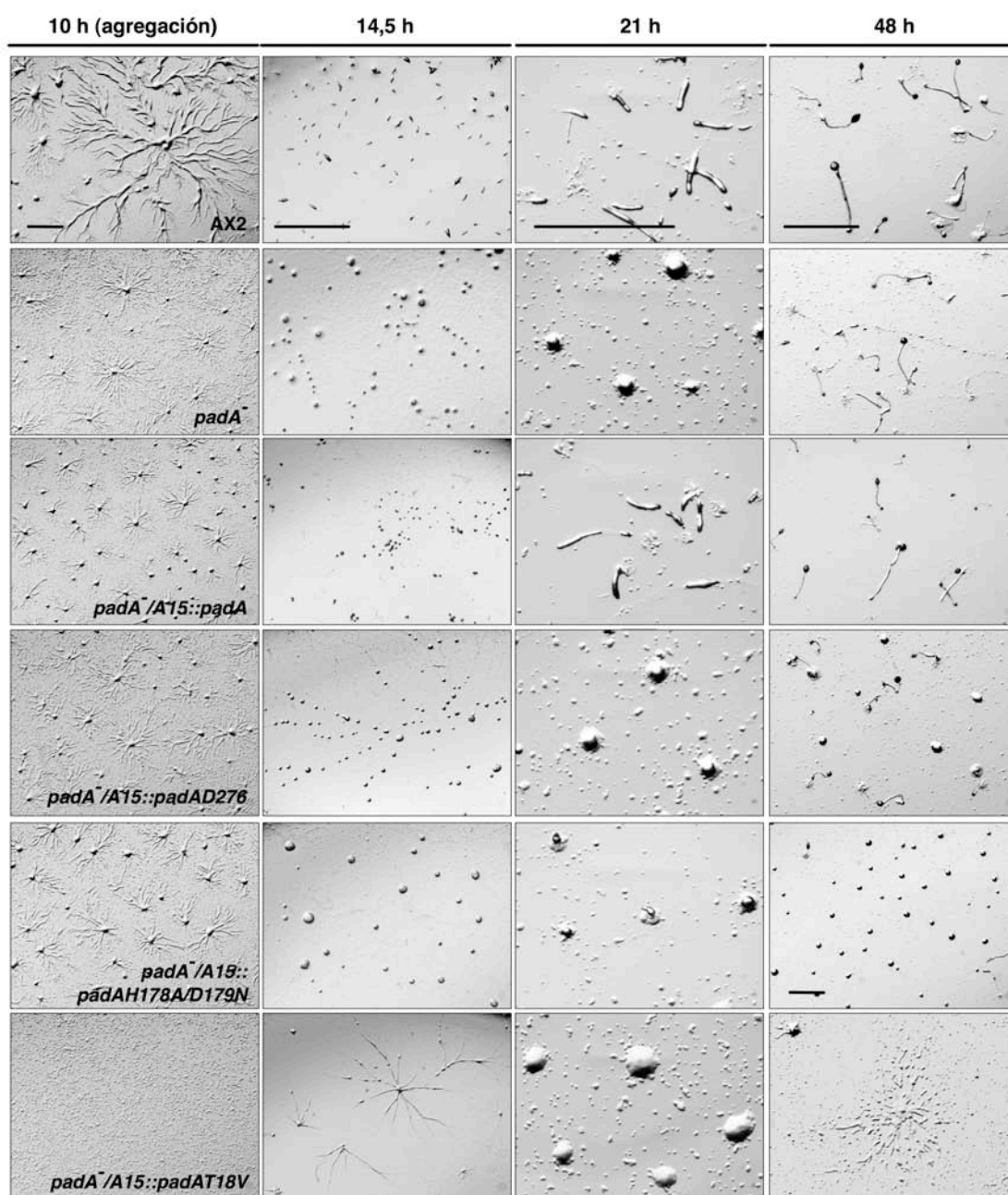
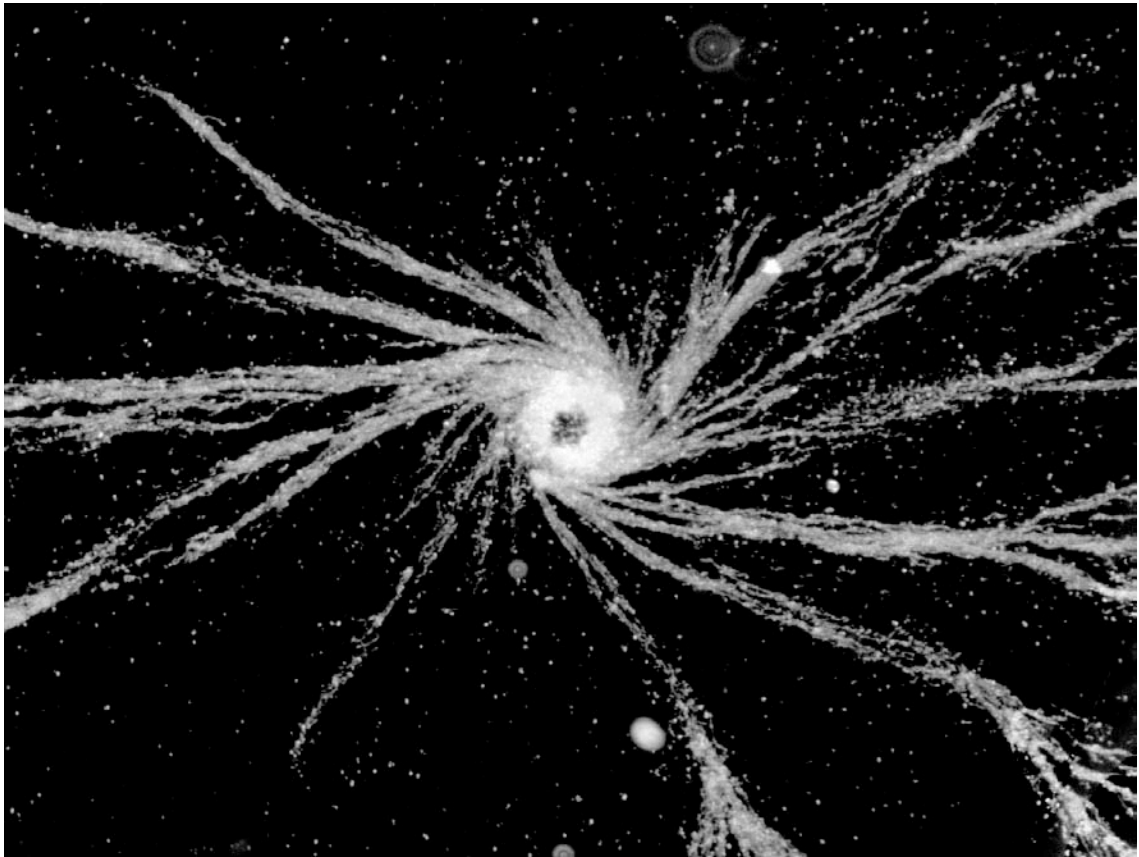


Figura 58. Fenotipo durante el desarrollo de las cepas portadoras de mutaciones *padA*/A15::*padAH178A/D179N*, *padA*/A15::*padAT18V*, el truncamiento *padA*/A15::*padAD276* y la sobreexpresión *padA*/A15::*padA*. Las células en ayuno se depositaron sobre agar ultrapuro y se tomaron imágenes a los tiempos indicados. Barra: 1 mm.



5

Discusión

5.1 PADA REGULA EL TAMAÑO DEL TERRITORIO EN *D. DISCOIDEUM* A TRAVÉS DEL RELÉ EXTRACELULAR DEL AMPc

El mutante *pada*⁻ forma un número de territorios de agregación considerablemente mayor que el tipo silvestre, y por lo tanto, de inferior tamaño. El tamaño del territorio de agregación depende, de forma directa, de la frecuencia y magnitud de los pulsos de AMPc y existen evidencias de territorios pequeños, tanto por exceso de AMPc, como por defecto de AMPc (Kesbeke y Van Haastert., 1988; Jang y Gomer, 2008; Faure *et al.*, 1988; Adames *et al.*, 1994; Palsson *et al.*, 1997; Thadani *et al.*, 1977). En el primer caso, el exceso de quimioatrayente satura los receptores de membrana del AMPc (CarA) durante la agregación, desensibilizándolos e impidiendo la transducción óptima de la señal (Thadani *et al.*, 1977; Jang y Gomer, 2008). Por el contrario, ante una señal pobre de AMPc, la baja intensidad del pulso no estimula el número de células necesario para la formación de territorios de tamaño normal (Faure *et al.*, 1988; Adames *et al.*, 1994; Palsson *et al.*, 1997). El análisis transcripcional de los genes del relé del AMPc en el mutante *pada*⁻ apoya la hipótesis de una baja producción de AMPc, ya que se observa una disminución consistente de los niveles de ARNm de *carA*, *pdsA* y *acaA*. Esto es compatible con el rescate del tamaño del territorio cuando se incrementa la densidad celular (Fig. 34). Al aumentar el número de células hasta 4 veces ($6,24 \times 10^5$ células/cm²) la mayor proximidad entre las células permite que sean estimuladas por los pulsos de AMPc, tal como se había descrito para el mutante *acaA*⁻/A15::*pka-cat*, que no produce niveles detectables de AMPc pero consigue agregar en alta densidad (Wang y Kuspa, 1997), o *dia2*⁻, que también produce niveles bajos de AMPc y sólo agrega en estas condiciones (Chae *et al.*, 1998). Nuestros datos también demuestran que la presencia de 1 mM cafeína, que anula específicamente la activación de AcaA (Brenner y Thoms, 1984), fenocopia los pequeños territorios de agregación de *pada*⁻ en el tipo silvestre.

La regulación a la baja de los niveles de expresión de *acaA*, *pdsA* y *carA* no permite separar si el fenotipo se debe a la disminución en la producción de AMPc, y por lo tanto una inducción deficiente de la expresión de *pdsA* y *carA*, o si por el contrario, el descenso en la expresión de *pdsA* y *carA* puede propiciar una saturación del sistema, por el exceso de AMPc acumulado, y la consecuente desensibilización de los receptores (Dinauer *et al.*, 1980; Aubry y Firtel, 1999). De hecho, los niveles de AMPc presentes en el medio extracelular de células ayunadas en alta densidad, (Fig. 41) son, al menos, similares a los del tipo silvestre, si no más altos, como consecuencia de la menor actividad fosfodiesterasa extracelular (Fig. 39). Sin embargo, ésta no parece ser la única razón subyacente al fenotipo de *padA*⁻, ya que al aumentar la actividad de PdsA durante la agregación, añadiendo 0,25 mM DTT (Kessin *et al.*, 1979; Franke y Kessin, 1981), no se restaura ni mejora el defecto en agregación de *padA*⁻ (Fig. 38), como tampoco lo hace la adición del medio condicionado de células silvestres de 7 h (Fig. 37) (Darmon *et al.*, 1978). Es posible proponer que los pequeños territorios durante la agregación de *padA*⁻ se originen por una combinación de ambas situaciones, pulsos cortos de AMPc y, relativamente, pocas moléculas de CarA que no se desensibilizan correctamente.

Mimetizar los pulsos de AMPc exógenamente rescata la agregación y la expresión génica temprana en mutantes incapaces de sintetizar AMPc, como *acaA*⁻ (Pitt *et al.*, 1993) o *crac*⁻ (Insall *et al.*, 1994a), sin embargo, no restauran el defecto en agregación, polarización celular o de expresión génica de *padA*⁻. El mutante *padA*⁻ exhibe respuesta a los pulsos, ya que los niveles de ARNm de *acaA*, *pdsA* y *carA* aumentan, pero no alcanzan los niveles silvestres (Fig. 48). Esto sugiere que una parte del defecto en la inducción de los genes del relé se debe a la ausencia o la baja intensidad de los pulsos discretos de AMPc, pero la causa inicial del fenotipo es intrínseca al mutante.

En *padA*⁻, el perfil temporal de expresión de la mayoría de los genes, incluidos *acaA* y *pdsA*, sigue el patrón silvestre, pero sólo alcanzan la mitad del valor máximo del silvestre. La expresión de *carA*, que alcanza un 65% de la expresión máxima de AX2, está además retrasada en el tiempo (Fig. 44). Otros genes inducibles en diferente medida por AMPc como *cadA*, *csA* o *tgrC* (Yang *et al.*, 1997; Desbarats *et al.*, 1992; Iranfar *et al.*, 2003; Dynes *et al.*, 1994) responsables de la adhesión célula-célula, tampoco alcanzan los niveles silvestres durante el desarrollo. En consecuencia, *padA*⁻ muestra defectos en la agregación temprana, con una adhesión significativamente inferior en el desarrollo temprano, precisamente cuando se establecen los centros de agregación (4-8 h, Fig. 42. B), y también en el desarrollo más tardío (estadios *tipped mound-first finger*) (Fig. 42. C). Además, el ligero incremento de sensibilidad a la presencia de EDTA mostrado por las células *padA*⁻ en el desarrollo temprano es indicativo de

una menor cantidad de moléculas CadA. Tanto *csA* como *tgrC* muestran el mismo comportamiento que los genes del relé de AMPc a los pulsos exógenos de AMPc y no alcanzan los niveles silvestres; por el contrario, *cadA* es el único de los genes analizados que alcanza niveles silvestres de expresión en *padA*⁻ tras los pulsos. De hecho, el mero hecho de concentrar las células para el ensayo (2×10^7 células/mL), consigue igualar el grado de expresión silvestre (Fig. 48. C). Este comportamiento podría deberse a factores independientes de PadA, ya que recientemente se han identificado nuevas funciones de *cadA* en el desarrollo, la morfogénesis, y la diferenciación celular (Kim *et al.*, 2011; Sriskanthadevan *et al.*, 2011). Su transcripción, además de por AMPc (Yang *et al.*, 1997) también está regulada por PSF durante el GDT (Rathi y Clarke, 1992; Sriskanthadevan *et al.*, 2011), y no se puede descartar que debido a la alta concentración celular, la actividad residual de PSF induzca niveles silvestres de *cadA*.

Los bajos niveles de expresión que alcanzan los genes inducibles por AMPc en el mutante, pueden también explicar su menor sensibilidad en la respuesta quimiotáctica hacia el AMPc (Fig. 40). De hecho, las cadenas de células de *padA*⁻ que responden al gradiente de AMPc son más cortas y engrosadas, una morfología descrita para mutantes con bajos niveles de PdsA, donde las altas concentraciones locales de AMPc saturan por completo los receptores CarA por la insuficiente degradación del quimioatrayente (García *et al.*, 2008).

Es de destacar que los niveles de mensajero de RegA o los genes responsables de la señalización del GMPc no están alterados. Es decir, no todos los genes inducidos/necesarios en el inicio del desarrollo están desregulados en *padA*⁻, sino que los datos apuntan específicamente a una deficiencia en el relé extracelular de AMPc. El hecho de que en quimeras con el tipo silvestre, *padA*⁻ se distribuya homogéneamente en los centros de agregación y en los *streams* (Fig. 33) sugiere que la capacidad de respuesta a la señalización del AMPc está razonablemente preservada en el mutante y su fenotipo suma, al defecto original, un desequilibrio funcional cuya base reside en la retroalimentación del relé de AMPc durante la agregación en *Dictyostelium* (Loomis *et al.*, 2008), magnificando su defecto.

5.2 EL RECEPTOR DEL AMPc, CarA, ES LIMITANTE DURANTE LA AGREGACIÓN Y LA CULMINACIÓN DE *padA*⁻

Para identificar cual es el componente(s) que está regulado(s) por PadA y el origen del defecto, se intentó la restauración del fenotipo (total o parcial) expresando individualmente los genes del relé. Se descartó la transformación con el gen *pdsA* porque su sobreexpresión da lugar a agregados aberrantes, acelerados en el tiempo que no forman *streams* (Faure *et al.*, 1988; Traynor *et al.*, 1992). La sobreexpresión de *acaA* (*padA*⁻/A15::*acaA*) no rescata el

fenotipo en agregación de *padA*⁻ (Fig. 51. A y C) como era de esperar, ya que los pulsos exógenos de AMPc no restauraron el fenotipo ni la expresión génica. La expresión constitutiva del receptor CarA, restaura no sólo el tamaño del territorio, sino la velocidad de agregación y aumenta los niveles de expresión génica de *acaA*, *pdsA* y *gpaB* (subunidad α de la proteína G acoplada da CarA) y los genes de adhesión *cadA* y *csA* (Fig. 53 y 54). La restauración morfológica y temporal de la culminación son el resultado, probablemente, del incremento del nivel de expresión de los genes del relé, *acaA* y *pdsA*. Sin embargo, la actividad fosfodiesterasa de esta cepa, medida con ensayos *in vivo*, no alcanza los niveles de AX2 (Fig. 52), lo que puede ser debido a la expresión constitutiva de *carA* o a que el defecto en el inicio del desarrollo de *padA*⁻ no esté corregido completamente.

Estos resultados sugieren que el mutante *padA*⁻ es deficitario en el receptor transmembrana CarA y concuerda con los fenotipos observados, que pueden atribuirse a una desensibilización sostenida de los receptores CarA, por una acumulación local de AMPc debido, entre otras causas, a la menor actividad fosfodiesterasa extracelular. De esta manera, al introducir CarA en alto número de copias se canalizaría el “exceso” de AMPc local, permitiendo la adaptación de la respuesta precedida por una re-sensibilización de los receptores residentes en *padA*⁻. Nuestros datos indican que una vez recuperado el número y la sensibilización de CarA en el mutante *padA*⁻, el resto de las rutas implicadas no están afectadas y el desarrollo se completa como en el tipo silvestre, por lo que CarA parece ser la proteína limitante.

Los genes *acaA*, *pdsA* y *carA*, contienen una región promotora distal que dirige su expresión de manera específica durante la agregación y/o los eventos tempranos del desarrollo (Alvarez-Curto *et al.*, 2005; Saxe *et al.*, 1991; Louis *et al.*, 1993; Hall *et al.* 1993; Podgorski *et al.*, 1988; Galardi-Castilla *et al.*, 2010). Se había comprobado que el ARNm del promotor específico de agregación de *acaA* reflejaba en *padA*⁻ el descenso observado en los niveles totales de transcripción del mensajero de *acaA* (Fig. 46). El análisis del promotor temprano de *carA* en el transformante *padA*⁻/A15::*carA*, donde no se pueden analizar los niveles totales de ARN mensajero de *carA*, reveló que su transcripción no está recuperada, y sí lo está la transcripción de *acaA* y *pdsA* (Fig. 53), por lo que la explicación más plausible es que la transcripción de *carA* está regulada, directa o indirectamente, por PadA, pero no la de los otros genes, cuyo descenso puede deberse únicamente a la desregulación del relé de AMPc. La regulación de la transcripción de *carA* es muy compleja y no se han identificado todos los componentes que la dirigen. Es uno de los primeros transcritos que aparecen en el desarrollo temprano y comienza a expresarse durante la transición GDT (*growth-development transition*), posiblemente debido a la acumulación de PSF (*pre-starvation factor*) y a la acción de CRTF (*carA transcription factor*)

(Saxe *et al.*, 1991; Louis *et al.*, 1993; Mu *et al.*, 1998, 2001). Durante este periodo la expresión de *carA*, junto a la de *pdsA* y *gpaB*, es independiente de AMPc (Louis *et al.*, 1993; Iranfar *et al.*, 2003). CRTF se une específicamente al promotor temprano de *carA* y activa su transcripción (Mu *et al.*, 1998, 2001). Es significativo el dato obtenido del análisis por micromatrices donde se observa que *crtf* está regulado al alza (Tabla 8), posiblemente para compensar los bajos niveles relativos de *carA*.

Los datos indican que, probablemente, la acción de PadA sobre el promotor de *carA*, a través de CRTF u otro factor de transcripción no descrito, es una consecuencia de la deficiencia que impide a *padA*⁻ crecer a la velocidad silvestre (Fig. 23) o no crecer a 27°C (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008) ni en medio mínimo (Fig. 23). Por esta razón, la cepa *padA*⁻/A15::*carA* tiene una velocidad de crecimiento semejante a la del mutante y se mantienen bajos los niveles de transcripción de *glkA* (glucoquinasa) (Fig. 54). Es decir, se recupera la normalidad en el proceso de agregación al elevar los niveles de proteína CarA, cuya deficiencia origina el defecto en el desarrollo del mutante *padA*⁻.

El transformante *padA*⁻/A15::*carA* completa el ciclo de desarrollo con normalidad y en el mismo tiempo que AX2. Esto indica que la presencia de más copias de CarA es suficiente para inducir adecuadamente la producción de AMPc desde el *tip* (Verkerke-van Wijk *et al.*, 2001) y completar la culminación, del mismo modo que rescata la agregación. No se ha comprobado si la expresión deslocalizada del promotor *acaA* o del transcrito tardío de *pdsA* (Fig. 55) se han restaurado, pero la complementación del fenotipo sugiere que se restaura la función silvestre durante la decisión de culminar. Esta desregulación podría explicar el defecto en la diferenciación celular de las subpoblaciones pre-tallo *pstA* y *pstAB* que se ha descrito en el mutante *padA*⁻ (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008).

5.3 UN POSIBLE PAPEL DE PadA EN EL CONTROL DE LA TRANSICIÓN GDT

El GDT implica el silenciamiento de los genes del crecimiento y la expresión de los genes del desarrollo temprano, entre ellos, *carA* (Rathi y Clarke, 1992; Jain *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1995a). Una posible causa de los bajos niveles de transcripción de *carA* en el mutante *padA*⁻, podría ser el control de la expresión de *carA* a través de la ruta YakA-PKA, mediada por PSF (Clarke *et al.*, 1988; Rathi y Clarke, 1992). La expresión del ARNm de *yakA* se induce en paralelo al aumento de la densidad celular y está regulada posteriormente durante el desarrollo (Souza *et al.*, 1998). La función de YakA durante el crecimiento vegetativo se centra en el control del ciclo celular y en la resistencia a distintos tipos de estrés (oxidativo,

nitrosativo, térmico, etc.) (Taminato *et al.*, 2002). Los niveles de mensajero de *yakA* están regulados a la baja durante el desarrollo de *padA*⁻ (Fig. 30) y no se recuperan en el transformante *padA*⁻/A15::*carA* (Fig. 54), lo que abre la posibilidad de que PadA regule de manera indirecta o directa a esta quinasa.

Hay otros componentes del GDT que no están afectados en el inicio del desarrollo en el mutante *padA*⁻, como *dscA* (discoidina) y *cmf* (*contioned medium factor*). Sin embargo, encontramos disminuídos los niveles de α -manosidasa, *manA* o *cadA* (Tablas 7 y 8, Fig. 43); o elevados los ARNm de *cmfB* (CRTF1) y *gpaA* (G α 1) (Tabla 8). Todos estos datos ponen en evidencia la complejidad del análisis del fenotipo de *padA*⁻, ya que muchas de las alteraciones podrían ser consecuencia del defecto original. Por ejemplo, los niveles altos de *cmfB* pueden deberse a un fenómeno compensatorio, ya que regula la expresión de genes implicados en la diferenciación celular dependientes de AMPc e independientes de proteína G en el GDT (Deery *et al.*, 2002).

5.4 PadA COMO POSIBLE INTEGRADOR DE DIFERENTES RUTAS METABÓLICAS

Hasta ahora, NmrA, y sus homólogos, se habían implicado exclusivamente en la represión por metabolito de nitrógeno en hongos (Andrianopoulous *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2007), y también se demostró que PadA contribuye a regular la expresión de los transportadores de amonio en *D. discoideum* (Núñez-Corcuera *et al.*, 2008). Más recientemente, en el hongo *Magnaporthe grisea*, se ha descrito la regulación conjunta del metabolismo de azúcares y la utilización de diversas fuentes de nitrógeno (Wilson *et al.*, 2007) a través de la enzima Tps-1 (Trehalosa-6-fosfato-sintasa), implicada en la síntesis de trehalosa a partir de glucosa-6-fosfato. Tps1, integra las dos rutas mediante la regulación enzimática de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato que genera poder reductor en forma de NADPH, y también regula la expresión de Nmr1 (Wilson *et al.*, 2007), homólogo de NmrA. Observaciones recientes en el hongo *Aspergillus nidulans* han relacionado a NmrA con la transducción de la señal NAD(P)⁺ que conecta el sistema de represión por nitrógeno con la disponibilidad de fuentes de carbono en la célula (Macios *et al.*, 2012). En el caso de *D. discoideum*, NADPH, el cofactor que une PadA, podría ser el nexo de unión entre ambas vías y permite plantear la posibilidad de que PadA module directa o indirectamente la regulación del metabolismo de las pentosas fosfato y del nitrógeno. En el análisis transcripcional durante el crecimiento realizado por micromatrices, se presentan datos que apuntan a una posible regulación del metabolismo, en general, y del de

carbohidratos, en particular, por parte de PadA (Fig. 26, Tabla 7 y 8). Se detecta la regulación diferencial de *g6pd*, regulada a la baja en condiciones de crecimiento en medio completo (HL5) (Tabla 7), o la de *amyA* (α -amilasa), regulada al alza en HL5 e implicada en la biosíntesis de la trehalosa (Tabla 7), o la regulación a la baja de *glk* (glucoquinasa, encargada de la síntesis de g-6-p, sustrato de Tps1 y G6PDH) incluso a lo largo del desarrollo temprano (Fig. 29. C); además de otros enzimas implicados en el metabolismo de carbohidratos como *pfkA* (fosfofructokinasa), *manA* (α -manosidasa) (Tabla 7 y 8), entre otros, la mayoría regulados a la baja en el mutante. Entre los genes diferencialmente regulados en el mutante *padA*, destacan, también, genes implicados en la biosíntesis de purinas (*purH*, *purC*, *purD*), regulados a la baja en ambas condiciones de crecimiento (HL5 y MM). Otros genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos también están regulados, la mayoría a la baja, en *padA*, lo que sugiere la implicación de PadA en el metabolismo del nitrógeno.

Los resultados del análisis de las micromatrices sugerían un posible defecto en el metabolismo de azúcares. Esta hipótesis, se ve reforzada por los niveles de ARNm más elevados de dos componentes del *counting factor* (CF), *ctnA* y *cf-50*, detectados en el desarrollo temprano del mutante (Fig. 29). La concentración del CF, que regula la adhesión y motilidad celular, está inversamente relacionada con la concentración de glucosa (Jang *et al.*, 2002), por lo que altos niveles de expresión se corresponden con baja glucosa intracelular (Jang *et al.*, 2009). Sin embargo, la suplementación de las células *padA* con diferentes azúcares no restauró su tasa de crecimiento silvestre (Fig. 28), ni la adición de glucosa durante la agregación consiguió recuperar el tamaño del territorio. Una hipótesis plausible es que PadA esté implicado en la regulación de alguna ruta de utilización de estos azúcares o en algún proceso autorregulado indispensable para la producción de NADPH.

5.5 VALIDACIÓN DEL MODELO ESTRUCTURAL PROPUESTO PARA PadA

Este trabajo ha permitido validar el modelo estructural de PadA propuesto por Núñez-Corcuera y col. (2008), donde se describe como una proteína *NmrA-like*. La funcionalidad de los sitios propuestos de unión a cofactor (T18) y el de unión con otras proteínas, posiblemente factores GATA (H178/D179), ha quedado demostrada al comprobarse que las proteínas mutantes se expresan y no complementan el fenotipo mutante (Fig. 56, 57, 58). Además, los análisis filogenéticos han situado a PadA más cerca de NmrA y de su homólogo en humanos NMRAL1 (HSCARG) que el resto de proteínas *NmrA-like* presentes en *D. discoideum*, a pesar de que éstas presenten mayor similitud a nivel de secuencia con NmrA que el propio PadA (Fig. 20 y 21). Estas evidencias, además de los datos que indican que PadA une de manera preferencial

y excluyente NADPH (respecto a NADP⁺, NADH o NAD⁺), sugieren que PadA es el verdadero homólogo de NmrA y NMRAL1 en *D. discoideum*, si bien no se pueden obviar las proteínas DDBG_0268206 y DDBG_0292738; a la misma distancia evolutiva de NmrA y NMRAL1 que PadA, aunque a día de hoy no se han caracterizado.

Las cepas que expresan constitutivamente la proteína silvestre y las mutantes PadAT18V y PadAH178A/D179N, aportan información muy valiosa acerca de la posible función de PadA en el crecimiento y desarrollo de este organismo. El hecho de que la expresión constitutiva de PadA (*padA*/A15::*padA*) impida el crecimiento en medio mínimo, podría deberse a que el exceso de proteína uniera todo el NADPH del medio de forma indiscriminada, impidiendo que el cofactor esté disponible para las múltiples y esenciales funciones que desempeña (Fig. 24). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la expresión de PadAT18V (con el sitio de interacción a cofactor anulado) muestra un fenotipo aún más dramático (Fig. 58) y es letal en medio mínimo (Fig. 57), aunque esta proteína es menos estable, como también lo es PadAH178A/D179N (Fig. 56). La toxicidad de PadA y PadAT18V puede deberse a dos causas diferentes, la sobre-expresión de PadA puede originar el agotamiento del NADPH en condiciones de restricción nutricional, situación mimetizada en el medio mínimo. Mientras que la toxicidad de la proteína mutante PadAT18V, puede deberse a interacciones con otras proteínas, verdaderas o espurias, que lastren las funciones celulares; lo que sugiere que, en PadA, la forma no unida a cofactor es capaz de interactuar con otras proteínas. Por otra parte, es interesante observar que la proteína que conserva el sitio de unión a NADPH intacto, pero carece de sitio de unión a factor GATA funcional, crece mejor que PadAT18V y que el propio *padA* en medio HL5 y medio mínimo (Fig. 57), es decir, parece recuperar, siquiera parcialmente, alguna de las funciones de PadA. Esto podría sugerir que PadA es capaz de interactuar con distintas proteínas y las mutaciones presentes en PadAH178A/D179N no afectan a todas las posibles interacciones. El homólogo de PadA en humanos, hNMRAL-1, interacciona con la arginino-succinato-sintasa, implicada en la síntesis de NO, y con dos moduladores más de la función de NF-κB, COMMD y RelA (Zhao *et al.*, 2008; Lian y Zengh, 2009; Gan *et al.*, 2009).

5.6 MODELO PROPUESTO

Las proteínas de la familia NmrA se han propuesto como sensores metabólicos o redox que transmiten información sobre el estado de la célula al mecanismo de transcripción génica (Shi y Shi, 2004; Lamb *et al.*, 2008). El estado metabólico de la célula se refleja en la proporción de NAD(P)⁺/NAD(P)H y la capacidad de estas proteínas de unir específicamente un cofactor

modula su función. Las proteínas *NmrA-like* tienen la capacidad de interaccionar con otras proteínas e interferir con su función.

Atendiendo a las evidencias mostradas a lo largo de este trabajo, proponemos que esta proteína, que une NADPH específicamente, es capaz de monitorizar el nivel de energía de la célula y modular, mediante la interacción con más de una proteína, la expresión de genes del metabolismo primario (como el metabolismo de aminoácidos) y de genes esenciales para el desarrollo, como *carA*.

Basándonos en los datos de sobre-expresión de las proteínas silvestre y mutantes, proponemos que la forma activa de PadA, es decir la que interacciona con otras proteínas, es la forma no unida a NADPH y el fenotipo deletéreo de PadAT18V, y que no presenta PadAH178A/D179N, se debe a que es insensible a la presencia del cofactor y mantiene interacciones que deberían terminar. Esta hipótesis también podría explicar, en parte, la letalidad en crecimiento (en MM) de la sobre-expresión de PadA, ya que al agotar todo el NADPH disponible en la célula, el exceso de proteína no unida a NADPH también se volvería incapaz de reprimir sus interacciones y el efecto sobre el crecimiento se asemejaría al de PadAT18V, como de hecho ocurre. De la misma manera, también explica la complementación parcial del fenotipo de PadAH178A/D179N durante el crecimiento, y sugiere que mecanismos distintos, o distintas regiones de la proteína PadA, participan en la modulación del metabolismo/crecimiento y del desarrollo, proceso que ninguna de las dos proteínas mutantes rescata.

Hacen falta nuevos experimentos para definir el papel de PadA en el ciclo de vida de *D. discoideum*, pero es sugestivo pensar que funciona como un sensor metabólico que transmite esta información modulando la acción de factores transcripcionales, tanto durante el crecimiento como el desarrollo de *D. discoideum*, y sea uno más de los múltiples componentes de la complicada regulación del ciclo de vida de este organismo. En la Figura 59 se resume, de forma general, el modelo propuesto.

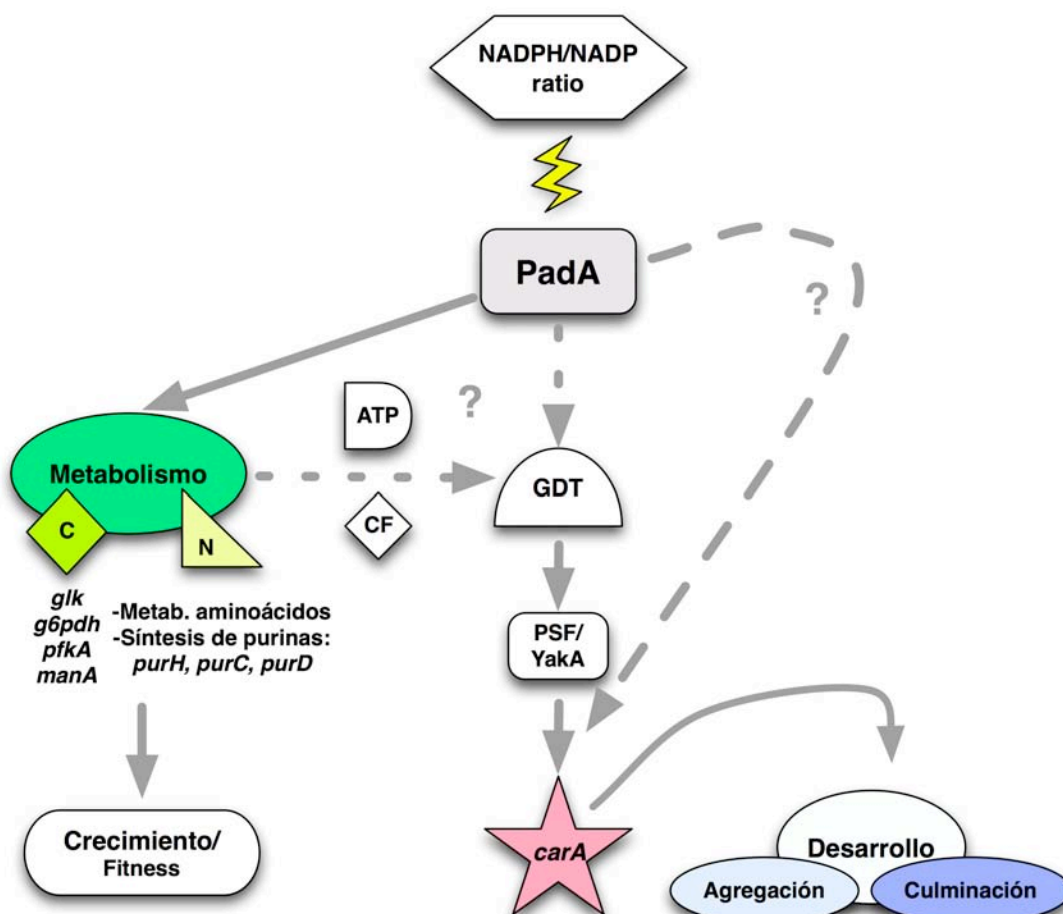
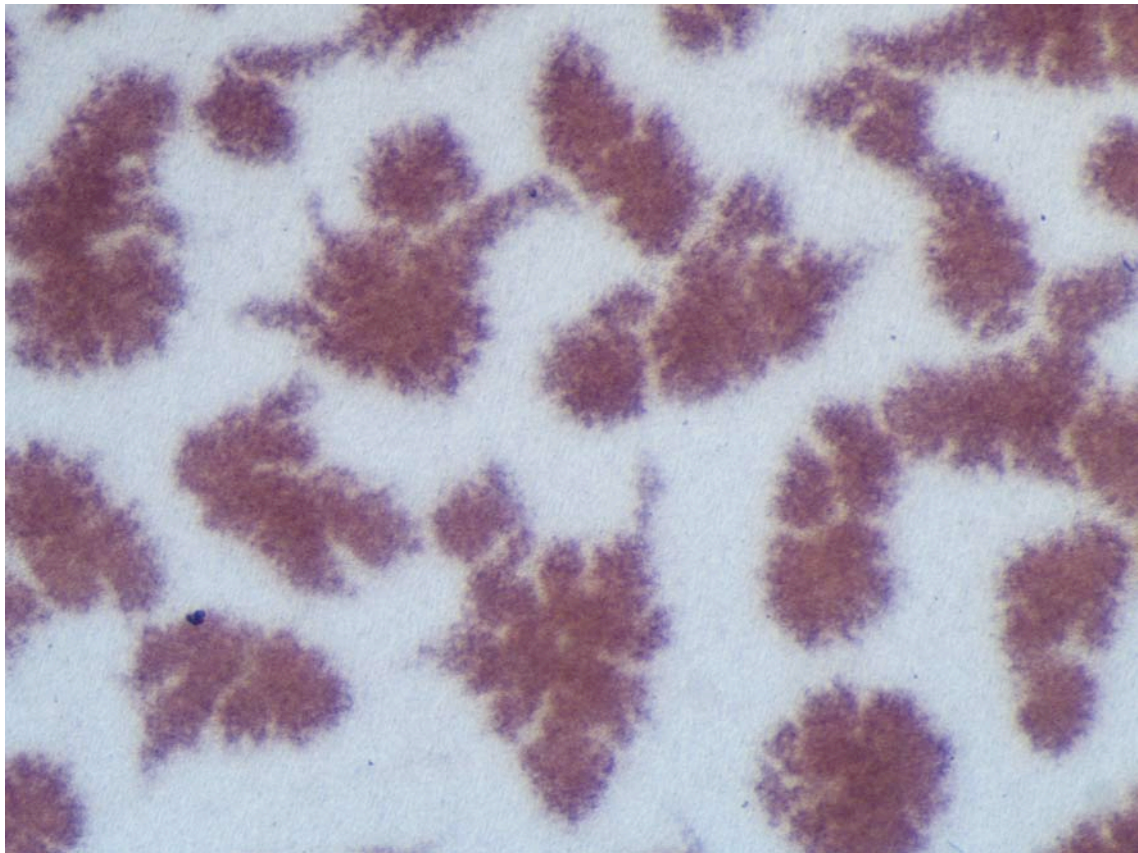


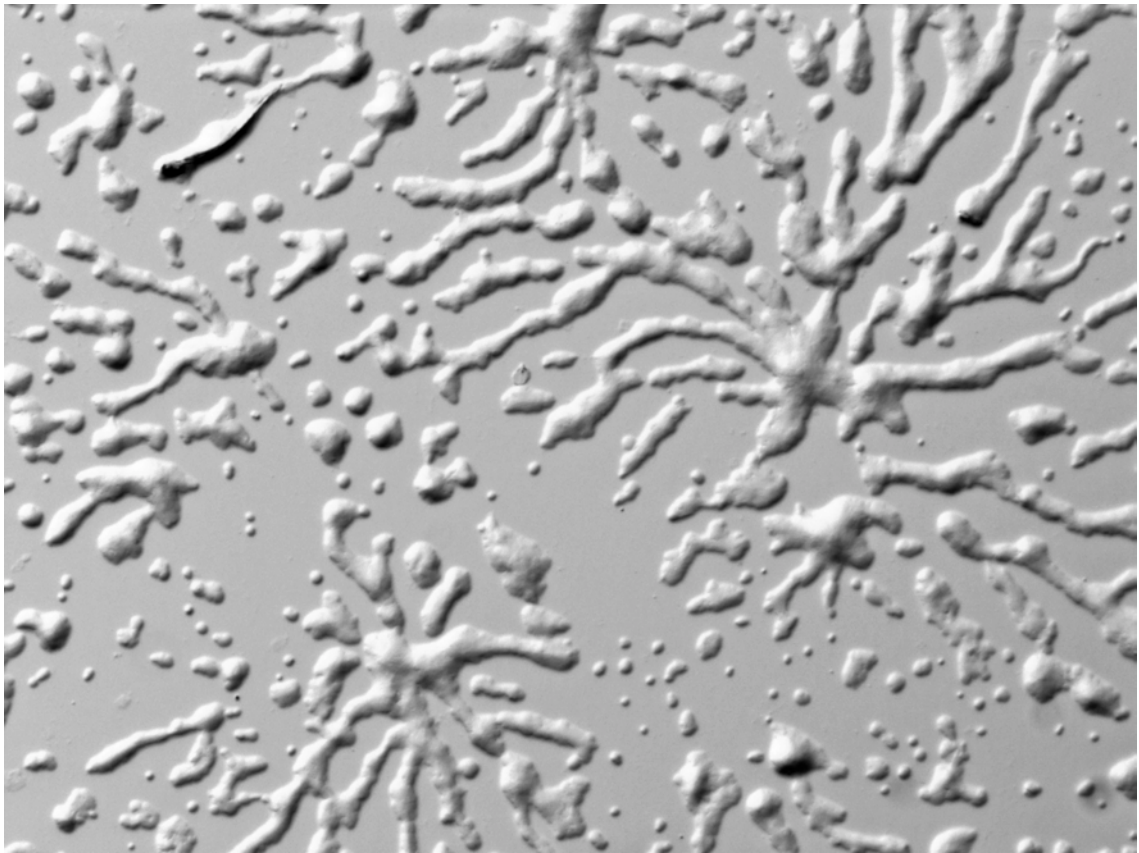
Figura 59. Esquema simplificado que resume las funciones y posibles funciones de PadA durante todo el ciclo de vida de *D. discoideum*. Se han coloreado aquellos procesos/proteínas en las que se ha probado que PadA interviene a lo largo de este trabajo.



6

Conclusiones

1. La proteína mutante PadAD276 es inestable y está ausente en el mutante *padA*⁻, lo que demuestra que es un mutante de falta de función.
2. El dominio de unión a cofactor propuesto en la proteína PadA, que incluye el residuo T18, y el dominio de interacción con otras proteínas, que incluye los residuos H178 y D179, son necesarios para la función de PadA.
3. PadA es, junto a DDB_G0268206 y DDB_G0292738, la proteína filogenética y estructuralmente más cercana a NmrA en *D. discoideum* y forma un clado filogenéticamente separado junto a NmrA de *A. nidulans* y NMRAL1 de humanos.
4. La proteína PadA es necesaria para el crecimiento en medio definido de *D. discoideum*, pero su sobre-expresión es letal en este mismo medio.
5. La expresión del 3,7% de los genes presentes en las micromatrices de ADNc está alterado en el mutante *padA*⁻ durante el crecimiento vegetativo. Las modificaciones nunca exceden el doble ni descienden más de 0,3 veces.
6. La proteína PadA es necesaria para establecer el tamaño correcto de los territorios de agregación y las estructuras de desarrollo en *D. discoideum*.
7. La proteína PadA es necesaria para alcanzar el nivel máximo de expresión de los genes del relé del AMPc *acaA*, *pdsA* y *carA*.
8. La adhesión célula-célula está disminuida un $35 \pm 2\%$ entre las 4 y las 8 h del desarrollo en el mutante *padA*⁻. Los genes que codifican las tres principales proteínas de adhesión intercelular *cadA*, *csA* y *tgrC* están regulados a la baja en *padA*⁻.
9. La expresión del receptor de AMPc *carA*, dirigida por un promotor constitutivo en el mutante *padA*⁻, restaura el tamaño del territorio de agregación y rescata su retraso en el desarrollo.



7

Bibliografía

- Abedin, M. & King, N., 2010. Diverse evolutionary paths to cell adhesion. *Trends in Cell Biology*, 20(12), pp.734–742.
- Adames N.R. *et al.* 1994. Regulation of expression of the cyclic phosphodiesterase gene in phosphodiesterase inhibitor-negative mutants of *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry and Cell Biology*, 72(5-6), pp.233-8.
- Alexander, S. & Alexander, H., 2011. Lead genetic studies in *Dictyostelium discoideum* and translational studies in human cells demonstrate that sphingolipids are key regulators of sensitivity to cisplatin and other anticancer drugs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(1), pp.97–104.
- Alvarez-Curto, E. *et al.*, 2005. Evolutionary origin of cAMP-based chemoattraction in the social amoebae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), pp.6385–6390.
- Anjard, C. *et al.*, 1998. Signal transduction pathways leading to spore differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 193(2), pp.146–155.
- Andrianopoulos, A. *et al.*, 1998. Characterization of the *Aspergillus nidulans nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *Journal of bacteriology*, 180(7), pp.1973–1977.
- Araki, T. *et al.*, 1994. Cell-cycle-dependent sorting in the development of *Dictyostelium* cells. *Developmental Biology*, 162(1), pp.221–228.
- Ashburner, M. *et al.*, 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), pp.25–29.
- Aubry, L. *et al.*, 1997. The *Dictyostelium* mitogen-activated protein kinase ERK2 is regulated by Ras and cAMP-dependent protein kinase (PKA) and mediates PKA function. *The Journal of biological chemistry*, 272(7), pp.3883–3886.
- Aubry, L. & Firtel, R., 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, pp.469–517.
- Bader, S., Kortholt, A. & Van Haastert, P.J.M., 2007. Seven *Dictyostelium discoideum* phosphodiesterases degrade three pools of cAMP and cGMP. *Biochemical Journal*, 402(1), p.153.
- Bakthavatsalam, D. *et al.*, 2007. A G Protein-Coupled Receptor with a Lipid Kinase Domain Is Involved in Cell-Density Sensing. *Current Biology*, 17(10), pp.892–897.
- Bakthavatsalam, D. & Gomer, R.H., 2010. The secreted proteome profile of developing *Dictyostelium discoideum* cells. *Proteomics*, 10(13), pp.2556–2559.

- Baldauf, S.L. & Doolittle, W.F., 1997. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22), pp.12007–12012.
- Bapteste, E. *et al.*, 2002. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), pp.1414–1419.
- Barra, J. *et al.*, 1980. *pdsA*, a gene involved in the production of active phosphodiesterase during starvation of *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Molecular & general genetics*, 177(4), pp.607–613.
- Barth, C., Le, P. & Fisher, P., 2007. Mitochondrial Biology and Disease in *Dictyostelium*. *International Review of Cytology*, 263, pp.207–252.
- Baumann, P., 1969. Glucokinase of *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry* 8, pp. 5011-5
- Benabentos, R. *et al.*, 2009. Polymorphic Members of the lag Gene Family Mediate Kin Discrimination in *Dictyostelium*. *Current Biology*, 19(7), pp.567–572.
- Berks, M. & Kay, R.R., 1988. Cyclic AMP is an inhibitor of stalk cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 126(1), pp.108–114.
- Blander, G. & Guarente, L., 2004. The sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), pp.417–435.
- Bloomfield, G. *et al.*, 2010. Sex Determination in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science*, 330(6010), pp.1533–1536.
- Bloomfield, G., 2011. Genetics of sex determination in the social amoebae. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.608–616.
- Blusch, J., Morandini, P. & Nellen, W., 1992. Transcriptional regulation by folate: inducible gene expression in *Dictyostelium* transformants during growth and early development. *Nucleic Acids Research*, 20(23), pp.6235–6238.
- Bonner, J.T., 1947. Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of experimental zoology*, 106(1), pp.1–26.
- Bonner, J.T. *et al.*, 1969. Acrasin, Acrasinase, and the sensitivity to acrasin in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 20(1), pp.72–87.
- Bonner, J.T., 2006. Why size matters: from bacteria to blue whales. *Princeton University Press*.
- Bosgraaf, L. & Van Haastert, P.J.M., 2002. A model for cGMP signal transduction in *Dictyostelium* in perspective of 25 years of cGMP research. *Journal of muscle research and cell motility*, 23(7-8), pp.781–791.
- Bozzaro, S. & Eichinger, L., 2011. The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Current drug targets*, 12(7), pp.942–954.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.

- Brar, S.K. & Siu, C.H., 1993. Characterization of the cell adhesion molecule gp24 in *Dictyostelium discoideum*. Mediation of cell-cell adhesion via a Ca^{2+} -dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 268(33), pp.24902–24909.
- Brazill, D.T., Gundersen, R. & Gomer, R.H., 1997. A cell-density sensing factor regulates the lifetime of a chemoattractant-induced $\text{G}\alpha$ -GTP conformation. *FEBS letters*, 404(1), pp.100–104.
- Brazill, D.T. *et al.*, 1998. Cell density sensing mediated by a G protein-coupled receptor activating phospholipase C. *The Journal of biological chemistry*, 273(14), pp.8161–8168.
- Brefeld, O.1869. *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt*, 7, pp.85-107.
- Brenner, M. & Thoms, S.D., 1984. Caffeine blocks activation of cyclic AMP synthesis in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 101(1), pp.136–146.
- Brock, D.A. *et al.*, 1996. A *Dictyostelium* mutant with defective aggregate size determination. *Development*, 122(9), pp.2569–2578.
- Brock, D.A. & Gomer, R.H., 1999. A cell-counting factor regulating structure size in *Dictyostelium*. *Genes & Development*, 13(15), pp.1960–1969.
- Brock, D.A. *et al.*, 2002. The different components of a multisubunit cell number-counting factor have both unique and overlapping functions. *Development*, 129(15), pp.3657–3668.
- Brock, D.A. *et al.*, 2003. CF45-1, a secreted protein which participates in *Dictyostelium* group size regulation. *Eukaryotic Cell*, 2(4), pp.788–797.
- Brock, D.A. *et al.*, 2006. A 60-Kilodalton Protein Component of the Counting Factor Complex Regulates Group Size in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell*, 5(9), pp.1532–1538.
- Brown, J.M. & Firtel, R.A., 2000. Just the right size: cell counting in *Dictyostelium*. *Trends in genetics : TIG*, 16(5), pp.191–193.
- Brzostowski, J.A., Johnson, C. & Kimmel, A.R., 2002. $\text{G}\alpha$ -mediated inhibition of developmental signal response. *Current biology : CB*, 12(14), pp.1199–1208.
- Brzostowski, J.A., Parent, C.A. & Kimmel, A.R., 2004. A G α -dependent pathway that antagonizes multiple chemoattractant responses that regulate directional cell movement. *Genes & Development*, 18(7), pp.805–815.
- Burdine, V. & Clarke, M., 1995. Genetic and physiologic modulation of the prestarvation response in *Dictyostelium discoideum*. *Molecular biology of the cell*, 6(3), pp.311–325.
- Calvo-Garrido, J., Carilla-Latorre, S. & Escalante, R., 2008. Vacuole membrane protein 1, autophagy and much more. *Autophagy*, 4(6), pp.835–837.
- Calvo-Garrido, J. *et al.*, 2010. Autophagy in *Dictyostelium*: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy*, 6(6), pp.686–701.
- Cardelli, J., 2001. Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(5), pp.311–320.
- Carilla-Latorre, S. *et al.*, 2010. MidA is a putative methyltransferase that is required for

- mitochondrial complex I function. *Journal of Cell Science*, 123(10), pp.1674–1683.
- Carnell, M.J. & Insall, R.H., 2011. Actin on disease: Studying the pathobiology of cell motility using *Dictyostelium discoideum*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(1), pp.82–88.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), pp.540–552.
- Caterina, M.J., Hereld, D. & Devreotes, P.N., 1995. Occupancy of the *Dictyostelium* cAMP receptor, cAR1, induces a reduction in affinity which depends upon COOH-terminal serine residues. *The Journal of biological chemistry*, 270(9), pp.4418–4423.
- Chae, S.C. *et al.*, 1998. Underexpression of a novel gene, dia2, impairs the transition of *Dictyostelium* cells from growth to differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 252(1), pp.278–283.
- Chang, P. *et al.*, 2011. The antiepileptic drug valproic acid and other medium-chain fatty acids acutely reduce phosphoinositide levels independently of inositol in *Dictyostelium*. *Disease Models & Mechanisms*, 5(1), pp.115–124.
- Chattwood, A. & Thompson, C.R.L., 2011. Non-genetic heterogeneity and cell fate choice in *Dictyostelium discoideum*. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.558–566.
- Chen, Y. *et al.*, 2005. PldB, a putative phospholipase D homologue in *Dictyostelium discoideum* mediates quorum sensing during development. *Eukaryotic Cell*, 4(4), pp.694–702.
- Chen, G., Zhuchenko, O. & Kuspa, A., 2007. Immune-like Phagocyte Activity in the Social Amoeba. *Science*, 317(5838), pp.678–681.
- Clarke, M., Kayman, S.C. & Riley, K., 1987. Density-dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, 34(2), pp.79–87.
- Clarke, M., Yang, J. & Kayman, S.C., 1988. Analysis of the prestarvation response in growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Developmental genetics*, 9(4-5), pp.315–326.
- Clarke, M. & Gomer, R.H., 1995. PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia*, 51(12), pp.1124–1134.
- Coates, J.C. & Harwood, A.J., 2001. Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), pp.4349–4358.
- Comer, F.I. & Parent, C.A., 2006. Phosphoinositide 3-kinase activity controls the chemoattractant-mediated activation and adaptation of adenylyl cyclase. *Molecular biology of the cell*, 17(1), pp.357–366.
- Cornillon, S. *et al.*, 2006. An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium* amoebae with integrin beta features. *EMBO reports*, 7(6), pp.617–621.
- Cornillon, S., Froquet, R. & Cosson, P., 2008. Involvement of Sib Proteins in the Regulation of Cellular Adhesion in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell*, 7(9), pp.1600–1605.
- Cosson, P. & Soldati, T., 2008. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 11(3), pp.271–276.
- Dai, X. *et al.*, 2009. NADPH is an Allosteric Regulator of HSCARG. *Journal of Molecular Biology*,

- 387(5), pp.1277–1285.
- Dallon, J., 2005. Mathematically modelling the effects of counting factor in *Dictyostelium discoideum*. *Mathematical Medicine and Biology*, 23(1), pp.45–62.
- Darmon, M., Barra, J. & Brachet, P., 1978. The role of phosphodiesterase in aggregation of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Science*, 31, pp.233–243.
- Deery, W.J., 2002. A Single Cell Density-sensing Factor Stimulates Distinct Signal Transduction Pathways through Two Different Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp.31972–31979.
- Desbarats, L. *et al.*, 1992. Identification of a unique cAMP-response element in the gene encoding the cell adhesion molecule gp80 in *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*, 267(27), pp.19655–19664.
- Desjardins, M., Houde, M. & Gagnon, E., 2005. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunological reviews*, 207, pp.158–165.
- Detterbeck, S. *et al.*, 1994. The “prespore-like cells” of *Dictyostelium* have ceased to express a prespore gene: analysis using short-lived beta-galactosidases as reporters. *Development*, 120(10), pp.2847–2855.
- Devreotes, P.N. & Sherring, J.A., 1985. Kinetics and concentration dependence of reversible cAMP-induced modification of the surface cAMP receptor in *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, 260(10), pp.6378–6384.
- Dharmawardhane, S. *et al.*, 1994. Regulatory role of the G alpha 1 subunit in controlling cellular morphogenesis in *Dictyostelium*. *Development*, 120(12), pp.3549–3561.
- Dinauer, M.C., Steck, T.L., Devreotes, P.N., 1980. Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* V. Adaptation of the cAMP signaling response during cAMP stimulation. *Journal in Cell Biology*, 86(2), pp.554–61.
- Dormann, D. *et al.*, 2001. cAMP receptor affinity controls wave dynamics, geometry and morphogenesis in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 13), pp.2513–2523.
- Dynes, J.L. *et al.*, 1994. LagC is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes & Development*, 8(8), pp.948–958.
- Early, A., Abe, T. & Williams, J., 1995. Evidence for positional differentiation of prestalk cells and for a morphogenetic gradient in *Dictyostelium*. *Cell*, 83(1), pp.91–99.
- Eichinger, L. *et al.*, 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435(7038), pp.43–57.
- Escalante, R. & Sastre, L., 1998. A Serum Response Factor homolog is required for spore differentiation in *Dictyostelium*. *Development*, 125(19), pp.3801–3808.
- Escalante, R. & Vicente, J.J., 2000. *Dictyostelium discoideum*: a model system for differentiation and patterning. *The International Journal of Developmental Biology*, 44(8), pp.819–835.
- Escalante, R. & Sastre, L., 2006. Investigating gene expression: *in situ* hybridization and reporter genes. *Methods in Molecular Biology*, 346, pp.247–60.

- Escalante, R., 2011. *Dictyostelium* as a model for human disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(1), p.69.
- Faix, J., 2004. A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Research*, 32(19), pp.e143–e143.
- Fang, R., Xiong, Y. & Singleton, C.K., 2003. IfkA, a presumptive eIF2 alpha kinase of *Dictyostelium*, is required for proper timing of aggregation and regulation of mound size. *BMC Developmental Biology*, 3, p.3.
- Faure, M. *et al.*, 1988. Disruption of *Dictyostelium discoideum* morphogenesis by overproduction of cAMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21), pp.8076–8080.
- Faure, M. *et al.*, 1989. Rescue of a *Dictyostelium discoideum* mutant defective in cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Developmental Biology*, 131(2), pp.366–372.
- Faure, M. *et al.*, 1990. The cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum* contains three promoters specific for growth, aggregation, and late development. *Molecular and cellular biology*, 10(5), pp.1921–1930.
- Ferguson, S.S. & Caron, M.G., 1998. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(2), pp.119–127.
- Fey, P. *et al.*, 2002. SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 159(6), pp.1109–1119.
- Fontana, D.R., 1993. Two distinct adhesion systems are responsible for EDTA-sensitive adhesion in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, 53(3), pp.139–147.
- Fountain, S.J., 2009. Neurotransmitter Receptor Homologues of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 41(2), pp.263–266.
- Francione, L.M. & Fisher, P.R., 2011. Heteroplasmic mitochondrial disease in *Dictyostelium discoideum*. *Biochemical Pharmacology*, 82(10), pp.1510–1520.
- Franke, J. & Kessin, R., 1977. A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(5), pp.2157–2161.
- Franke, J. & Kessin, R.H., 1981. The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 256(14), pp.7628–7637.
- Franke, J., Podgorski, G.J. & Kessin, R.H., 1987. The expression of two transcripts of the phosphodiesterase gene during the development of *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 124(2), pp.504–511.
- Franke, J. *et al.*, 1991. Cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum* and its glycoprotein inhibitor: structure and expression of their genes. *Developmental genetics*, 12(1–2), pp.104–112.
- Fu, Y.H., Young, J.L. & Marzluf, G.A., 1988. Molecular cloning and characterization of a negative-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Molecular & general genetics : MGG*,

- 214(1), pp.74–79.
- Fukuzawa, M., Hopper, N. & Williams, J., 1997. *cudA*: a *Dictyostelium* gene with pleiotropic effects on cellular differentiation and slug behaviour. *Development*, 14, pp.2719–2728.
- Fukuzawa, M. & Williams, J.G., 2000. Analysis of the promoter of the *cudA* gene reveals novel mechanisms of *Dictyostelium* cell type differentiation. *Development*, 127(12), pp.2705–2713.
- Fukuzawa, M., 2006. Regulation of *Dictyostelium* prestalk-specific gene expression by a SHAQKY family MYB transcription factor. *Development*, 133(9), pp.1715–1724.
- Galardi-Castilla, M. *et al.*, 2010. The *Dictyostelium discoideum* *acaA* Gene Is Transcribed from Alternative Promoters during Aggregation and Multicellular Development. *PLoS ONE*, 5(10), p.e13286.
- Gene Ontology Consortium, 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), pp.258D–261.
- Gan, Q. *et al.*, 2009. HSCARG inhibits activation of NF- κ B by interacting with I κ B kinase. *Journal of Cell Science*, 122(22), pp.4081–4088.
- Gao, T. *et al.*, 2004. A cell number counting factor regulates Akt/protein kinase B to regulate *Dictyostelium discoideum* group size. *Eukaryotic Cell*, 3(5), pp.1176–1184.
- Garcia, G.L. & Parent, C.A., 2008. Signal relay during chemotaxis. *Journal of microscopy*, 231(3), pp.529–534.
- Garcia, G.L. *et al.*, 2009. The group migration of *Dictyostelium* cells is regulated by extracellular chemoattractant degradation. *Molecular biology of the cell*, 20(14), pp.3295–3304.
- Garrod, D.R. & Ashworth, I.M., 1972. Effect of growth conditions on development of the cellular slime mould, *Dictyostelium discoideum*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 28(2), pp.463–479.
- Golstein, P., Aubry, L. & Levraud, J.-P., 2003b. Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(10), pp.798–807.
- Gomer, R.H., Datta, S. & Firtel, R.A., 1986. Cellular and subcellular distribution of a cAMP-regulated prestalk protein and prespore protein in *Dictyostelium discoideum*: a study on the ontogeny of prestalk and prespore cells. *The Journal of Cell Biology*, 103(5), pp.1999–2015.
- Gomer, R.H., 2001. Not being the wrong size. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1), pp.48–54.
- Gomer, R.H. *et al.*, 2002. Cell motility mediates tissue size regulation in *Dictyostelium*. *Journal of muscle research and cell motility*, 23(7-8), pp.809–815.
- Gomer, R.H., Jang, W. & Brazill, D., 2011. Cell density sensing and size determination. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.482–494.
- Gregor, T. *et al.*, 2010. The Onset of Collective Behavior in Social Amoebae. *Science*, 328(5981), pp.1021–1025.
- Guarente, L., 1999. Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nature genetics*, 23(3), pp.281–285.

- Hall, A.L. *et al.*, 1993. The role of the cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum* during growth, aggregation, and morphogenesis: overexpression and localization studies with the separate promoters of the *pde*. *Developmental Biology*, 157(1), pp.73–84.
- Harwood, A.J., Hopper, N.A., Simon, M.N., Driscoll, D.M., Véron, M. & Williams, J.G., 1992. Culmination in *Dictyostelium* is regulated by the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 69(4), pp.615–624.
- Hägele, S. *et al.*, 2000. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cellular Microbiology*, 2(2), pp.165–171.
- Hirata, K. *et al.*, 2008. Involvements of a novel protein, DIA2, in cAMP signaling and spore differentiation during *Dictyostelium* development. *Differentiation*, 76(3), pp.310–322.
- Hirose, S. *et al.*, 2011. Self-Recognition in Social Amoebae Is Mediated by Allelic Pairs of Tiger Genes. *Science*, 333(6041), pp.467–470.
- Iijima, M. & Devreotes, P., 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell*, 109(5), pp.599–610.
- Imai, S. *et al.*, 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), pp.795–800.
- Insall, R., Kuspa, A., *et al.*, 1994a. CRAC, a cytosolic protein containing a pleckstrin homology domain, is required for receptor and G protein-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 126(6), pp.1537–1545.
- Insall, R.H., Soede, R.D., *et al.*, 1994b. Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Molecular biology of the cell*, 5(6), pp.703–711.
- Iranfar, N., Fuller, D. & Loomis, W.F., 2003. Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell*, 2(4), pp.664–670.
- Iranfar, N., Fuller, D. & Loomis, W.F., 2006. Transcriptional regulation of post-aggregation genes in *Dictyostelium* by a feed-forward loop involving GBF and LagC. *Developmental Biology*, 290(2), pp.460–469.
- Jain, R. *et al.*, 1992. A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes & Development*, 6(3), pp.390–400.
- Jang, W., Chiem, B. & Gomer, R.H., 2002. A secreted cell number counting factor represses intracellular glucose levels to regulate group size in dictyostelium. *The Journal of biological chemistry*, 277(42), pp.39202–39208.
- Jang, W. & Gomer, R.H., 2005. Exposure of cells to a cell number-counting factor decreases the activity of glucose-6-phosphatase to decrease intracellular glucose levels in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell*, 4(1), pp.72–81.
- Jang, W. & Gomer, R.H., 2006. A protein in crude cytosol regulates glucose-6-phosphatase activity in crude microsomes to regulate group size in *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, 281(24), pp.16377–16383.
- Jang, W. & Gomer, R.H., 2008. Combining experiments and modelling to understand size regulation in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of The Royal Society Interface*, 5(Suppl_1), pp.S49–S58.
- Jang, W., Schwartz, O.G. & Gomer, R.H., 2009. A cell number counting factor alters cell metabolism.

- Communicative & integrative biology*, 2(4), pp.293–297.
- Jang, W. & Gomer, R.H., 2011. Initial Cell Type Choice in *Dictyostelium*. *Eukaryotic Cell*, 10(2), pp.150–155.
- Jermyn K.A., Duffy K.T., Williams J.G., 1989. A new anatomy of the prestalk zone in *Dictyostelium*. *Nature*, 340(6229), pp.144–6.
- Johnson, R.L. *et al.*, 1991. Overexpression of the cAMP receptor 1 in growing *Dictyostelium* cells. *Biochemistry*, 30(28), pp.6982–6986.
- Jung, G. & Hammer, J.A., 1990. Generation and characterization of *Dictyostelium* cells deficient in a myosin I heavy chain isoform. *The Journal of Cell Biology*, 110(6), pp.1955–1964.
- Kallberg, Y. *et al.*, 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(18), pp.4409–4417.
- Kamboj, R.K., Lam, T.Y. & Siu, C.H., 1990. Regulation of slug size by the cell adhesion molecule gp80 in *Dictyostelium discoideum*. *Cell regulation*, 1(10), pp.715–729.
- Kamino, K., Fujimoto, K. & Sawai, S., 2011. Collective oscillations in developing cells: Insights from simple systems. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.503–517.
- Katoh, M. *et al.*, 2004. An orderly retreat: Dedifferentiation is a regulated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), pp.7005–7010.
- Katoh, M. *et al.*, 2007. Developmental Commitment in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell*, 6(11), pp.2038–2045.
- Katoh, K., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33(2), pp.511–518.
- Kaul, M. and Eichinger, L., 2006. Analysis of Gene Expression Using cDNA Microarrays. *Dictyostelium discoideum protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press. pp. 75–93.
- Kawata, T., 2011. STAT signaling in *Dictyostelium* development. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.548–557.
- Kay, R.R., 1989. Evidence that elevated intracellular cyclic AMP triggers spore maturation in *Dictyostelium*. *Development*, 105, pp.753–759.
- Kay, R.R., Flatman, P. & Thompson, C.R., 1999. DIF signalling and cell fate. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(6), pp.577–585.
- Kay, R.R. & Thompson, C.R.L., 2001. Cross-induction of cell types in *Dictyostelium*: evidence that DIF-1 is made by prespore cells. *Development*, 128(24), pp.4959–4966.
- Kay, R.R. & Thompson, C.R.L., 2009. Forming patterns in development without morphogen gradients: scattered differentiation and sorting out. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), p.a001503.
- Kesbeke, F., Snaar-Jagalska, B.E. & Van Haastert, P.J., 1988. Signal transduction in *Dictyostelium* *fgd* A mutants with a defective interaction between surface cAMP receptors and a GTP-binding regulatory protein. *The Journal of Cell Biology*, 107(2), pp.521–528.

- Kessin, R.H. *et al.*, 1979. Binding of inhibitor alters kinetic and physical properties of extracellular cyclic AMP phosphodiesterase from *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), pp.5450–5454.
- Kessin, R.H., 1988. Genetics of early *Dictyostelium discoideum* development. *Microbiological reviews*, 52(1), pp.29–49.
- Kessin R.H., 2001. *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity*. Cambridge University Press.
- Kim, J.Y. *et al.*, 1997. Phosphorylation of chemoattractant receptors is not essential for chemotaxis or termination of G-protein-mediated responses. *The Journal of biological chemistry*, 272(43), pp.27313–27318.
- Kim, H.J. *et al.*, 1998. A novel adenylyl cyclase detected in rapidly developing mutants of *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, 273(47), pp.30859–30862.
- Kim, J.S. *et al.*, 2011. Homeoprotein Hbx4 represses the expression of the adhesion molecule DdCAD-1 governing cytokinesis and development. *FEBS letters*, 585(12), pp.1864–1872.
- Kim, M.-K., Yim, H.-S. & Kang, S.-O., 2010a. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the NmrA-like DDB_G0286605 protein from the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Acta Cryst (2011)*. F67, 94-97, pp.1–4.
- Kim, M.-K., Yim, H.-S. & Kang, S.-O., 2010b. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the shortchain dehydrogenase/reductasetype DDB_G0291732 protein from *Dictyostelium discoideum*. *Acta Cryst (2011)*. F67, 98-100, pp.1–3.
- King, J.S. & Insall, R.H., 2009. Chemotaxis: finding the way forward with *Dictyostelium*. *Trends in Cell Biology*, 19(10), pp.523–530.
- Knecht, D.A., Fuller, D.L. & Loomis, W.F., 1987. Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 121(1), pp.277–283.
- Konijn, T.M. *et al.*, 1969. Identification of Adenosine-3“,5“-Monophosphate as the Bacterial Attractant for Myxamoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of bacteriology*, 99, pp.510–512.
- Kortholt, A. & Van Haastert, P.J.M., 2008. Highlighting the role of Ras and Rap during *Dictyostelium* chemotaxis. *Cellular Signalling*, 20(8), pp.1415–1422.
- Kriebel, P.W., Barr, V.A. & Parent, C.A., 2003. Adenylyl cyclase localization regulates streaming during chemotaxis. *Cell*, 112(4), pp.549–560.
- Kriebel, P. & Parent, C., 2004. Adenylyl Cyclase Expression and Regulation During the Differentiation of *Dictyostelium Discoideum*. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 56(9), pp.541–546.
- Kriebel, P.W. *et al.*, 2008. Collective cell migration requires vesicular trafficking for chemoattractant delivery at the trailing edge. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), pp.949–961.
- Kudla, B. *et al.*, 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal*, 9(5), pp.1355–1364.

- Kuspa, A. & Loomis, W.F., 1992. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), pp.8803–8807.
- Lacombe, M.L. *et al.*, 1986. Molecular cloning and developmental expression of the cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*, 261(36), pp.16811–16817.
- Lamb, H.K. *et al.*, 2003. The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *The Journal of biological chemistry*, 278(34), pp.32107–32114.
- Lamb, H.K. *et al.*, 2004. Modulation of the ligand binding properties of the transcription repressor NmrA by GATA-containing DNA and site-directed mutagenesis. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 13(12), pp.3127–3138.
- Lamb, H.K., Stammers, D.K. & Hawkins, A.R., 2008. Dinucleotide-Sensing Proteins: Linking Signaling Networks and Regulating Transcription. *Science Signaling*, 1(33), pp.pe38–pe38.
- Leach, C.K., Ashworth, J.M. & Garrod, D.R., 1973. Cell sorting out during the differentiation of mixtures of metabolically distinct populations of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 29(3), pp.647–661.
- Lian, M. & Zheng, X., 2009. HSCARG regulates NF-kappaB activation by promoting the ubiquitination of RelA or COMMD1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), pp.17998–18006.
- Loomis, W.F., 1998. Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), pp.684–694.
- Loomis, W.F., 2008. cAMP oscillations during aggregation of *Dictyostelium*. *Advances in experimental medicine and biology*, 641, pp.39–48.
- Louis, J.M., Saxe, C.L. & Kimmel, A.R., 1993. Two transmembrane signaling mechanisms control expression of the cAMP receptor gene CAR1 during *Dictyostelium* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), pp.5969–5973.
- Lowry, O.H. *et al.*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–275.
- Luciani, M.F. *et al.*, 2008. Autophagic or necrotic cell death triggered by distinct motifs of the differentiation factor DIF-1. *Cell Death and Differentiation*, 16(4), pp.564–570.
- Macios, M. *et al.*, 2012. The GATA factors AREA and AREB together with the co-repressor NMRA, negatively regulate arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* in response to nitrogen and carbon source. *Fungal Genetics and Biology*, 49(3), pp.189–198.
- Maeda, M. & Firtel, R.A., 1997. Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK2 by the chemoattractant folic acid in *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, 272(38), pp.23690–23695.
- Maeda, M. *et al.*, 2003. Changing patterns of gene expression in dictyostelium prestalk cell subtypes recognized by in situ hybridization with genes from microarray analyses. *Eukaryotic Cell*, 2(3), pp.627–637.
- Maeda, M. *et al.*, 2004. Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein

- kinases ERK2 and PKA. *Science*, 304(5672), pp.875–878.
- Maeda, Y., 2005. Regulation of Growth and Differentiation in *Dictyostelium*. *International Review of Cytology*, 244, pp.287–332.
- Maeda, Y., 2011. Cell-cycle checkpoint for transition from cell division to differentiation. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.463–481.
- Mahadeo, D. & Parent, C., 2006. Signal Relay During the Life Cycle of *Dictyostelium*. *Current Topics in Developmental Biology*, 73, pp.115–140.
- Malchow D, Nägele B, Schwarz H, Gerisch G. 1972. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *European Journal of Biochemistry*, 23;28(1), pp.136-42.
- Manahan, C.L. *et al.*, 2004. Chemoattractant signaling in *Dictyostelium discoideum*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), pp.223–253.
- Mann, S.K. & Firtel, R.A., 1991. A developmentally regulated, putative serine/threonine protein kinase is essential for development in *Dictyostelium*. *Mechanisms of development*, 35(2), pp.89–101.
- Mann, S.K. *et al.*, 1994. Expression of cAMP-dependent protein kinase in prespore cells is sufficient to induce spore cell differentiation in *Dictyostelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), pp.10561–10565.
- Mann, S.K. *et al.*, 1997. Role of cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in *Dictyostelium*. *Developmental Biology*, 183(2), pp.208–221.
- Marin, F.T., 1976. Regulation of development in *Dictyostelium discoideum*: I. Initiation of the growth to development transition by amino acid starvation. *Developmental Biology*, 48(1), pp.110–117.
- Maruo, T. *et al.*, 2004. Control of Cell Type Proportioning in *Dictyostelium discoideum* by Differentiation-Inducing Factor as Determined by In Situ Hybridization. *Eukaryotic Cell*, 3(5), pp.1241–1248.
- Marzluf, G.A., 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(1), pp.17–32.
- McMains, V.C., Liao, X.-H. & Kimmel, A.R., 2008. Oscillatory signaling and network responses during the development of *Dictyostelium discoideum*. *Ageing Research Reviews*, 7(3), pp.234–248.
- Meili, R. *et al.*, 1999. Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in *Dictyostelium*. *The EMBO Journal*, 18(8), pp.2092–2105.
- Meima, M. & Schaap, P., 1999. *Dictyostelium* development-socializing through cAMP. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(6), pp.567–576.
- Meyer, I., Kuhnert, O. & Gräf, R., 2011. Functional analyses of lissencephaly-related proteins in *Dictyostelium*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(1), pp.89–96.
- Milne, J.L. *et al.*, 1995. Seven helix cAMP receptors stimulate Ca²⁺ entry in the absence of functional G proteins in *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, 270(11), pp.5926–5931.

- Mohanty, S. *et al.*, 1999. Evidence that the *Dictyostelium* Dd-STATa protein is a repressor that regulates commitment to stalk cell differentiation and is also required for efficient chemotaxis. *Development*, 126(15), pp.3391–3405.
- Mu, X. *et al.*, 1998. Sequence-specific protein interaction with a transcriptional enhancer involved in the autoregulated expression of cAMP receptor 1 in *Dictyostelium*. *Development*, 125(18), pp.3689–3698.
- Mu, X. *et al.*, 2001. CRTF is a novel transcription factor that regulates multiple stages of *Dictyostelium* development. *Development*, 128(13), pp.2569–2579.
- Müller, K. *et al.*, 1979. A membrane glycoprotein of aggregating *Dictyostelium* cells with the properties of contact sites. *European journal of biochemistry / FEBS*, 99(2), pp.419–426.
- Noegel, A. *et al.*, 1986. Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *The EMBO Journal*, 5(7), pp.1473–1476.
- Núñez-Corcuera, B. *et al.*, 2008. A new protein carrying an NmrA-like domain is required for cell differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 321(2), pp.331–342.
- O'Day, D.H. & Keszei, A., 2011. Signalling and sex in the social amoebozoans. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*.
- Oppermann, U. *et al.*, 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, pp.247–253.
- Otsuka, H. & Van Haastert, P.J., 1998. A novel Myb homolog initiates *Dictyostelium* development by induction of adenylyl cyclase expression. *Genes & Development*, 12(11), pp.1738–1748.
- Pálsson, E. *et al.*, 1997. Selection for spiral waves in the social amoebae *Dictyostelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), pp.13719–13723.
- Pálsson, E., 2009. A cAMP Signaling Model Explains the Benefit of Maintaining Two Forms of Phosphodiesterase in *Dictyostelium*. *Biophysycal journal*, 97(9), pp.2388–2398.
- Pang, K.M., Lynes, M.A., and Knecht, D.A., 1998. Variables controlling the expresión level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid*, 41, pp.187–197.
- Parent, C.A., 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(1), pp.4–13.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), p.e45.
- Pitt, G.S. *et al.*, 1992. Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell*, 69(2), pp.305–315.
- Pitt, G.S. *et al.*, 1993. Extracellular cAMP is sufficient to restore developmental gene expression and morphogenesis in *Dictyostelium* cells lacking the aggregation adenylyl cyclase (ACA). *Genes & Development*, 7(11), pp.2172–2180.
- Podgorski, G.J. *et al.*, 1988. The cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum*: the structure of the gene and its regulation and role in development. *Developmental genetics*, 9(4-5), pp.267–278.

- Ponte, E. *et al.*, 1998. Detection of subtle phenotypes: the case of the cell adhesion molecule csA in *Dictyostelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), pp.9360–9365.
- Pupillo, M. *et al.*, 1992. Multiple cyclic AMP receptors are linked to adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Molecular biology of the cell*, 3(11), pp.1229–1234.
- Rai, M., Xiong, Y. & Singleton, C.K., 2006. Disruption of the *ifkA* and *ifkB* genes results in altered cell adhesion, morphological defects and a propensity to form pre-stalk O cells during development of *Dictyostelium*. *Differentiation*, 74(9-10), pp.583–595.
- Raper, K.B., 1935. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *Journal of Agricultural Research* 50, pp.135-147.
- Raper, K.B., 1940. Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of the Elisha Mitchell Society*, 56, pp.241-282.
- Rathi, A. & Clarke, M., 1992. Expression of early developmental genes in *Dictyostelium discoideum* is initiated during exponential growth by an autocrine-dependent mechanism. *Mechanisms of development*, 36(3), pp.173–182.
- Ray, S. *et al.*, 2011. Phospholipase D controls *Dictyostelium* development by regulating G protein signaling. *Cellular Signalling*, 23(2), pp.335–343.
- Rickenberg, H.V. *et al.*, 1975. Inhibition of development in *Dictyostelium discoideum* by sugars. *Journal of bacteriology*, 124(1), pp.212–219.
- Riedel, V. & Gerisch, G., 1971. Regulation of extracellular cyclic-AMP-phosphodiesterase activity during development of *Dictyostelium discoideum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 42(1), pp.119–124.
- Rivero, F., 2008. Endocytosis and the actin cytoskeleton in *Dictyostelium discoideum*. *International review of cell and molecular biology*, 267, pp.343–397.
- Roisin-Bouffay, C. *et al.*, 2000. A precise group size in *Dictyostelium* is generated by a cell-counting factor modulating cell-cell adhesion. *Molecular cell*, 6(4), pp.953–959.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), pp.1572–1574.
- Rosenzweig, B.A. *et al.*, 2004. Dye Bias Correction in Dual-labeled cDNA Microarray Gene Expression Measurements. *Environmental Health Perspectives*, 112, pp.480-487.
- Ross, F.M. & Newell, P.C., 1981. Streamers: chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum* with altered cyclic GMP metabolism. *Journal of general microbiology*, 127(2), pp.339–350.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F, and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Saran, S. *et al.*, 2002. cAMP signaling in *Dictyostelium*. Complexity of cAMP synthesis, degradation and detection. *Journal of muscle research and cell motility*, 23(7-8), pp.793–802.
- Saran, S. & Schaap, P., 2004. Adenylyl cyclase G is activated by an intramolecular osmosensor. *Molecular biology of the cell*, 15(3), pp.1479–1486.

- Saxe, C.L. *et al.*, 1991. Expression of a cAMP receptor gene of *Dictyostelium* and evidence for a multigene family. *Genes & Development*, 5(1), pp.1–8.
- Schaap, P., 2011a. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development*, 138(3), pp.387–396.
- Schaap, P., 2011b. Evolution of developmental cyclic adenosine monophosphate signaling in the *Dictyostelia* from an amoebozoan stress response. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.452–462.
- Schatzle, J. *et al.*, 1991. Developmental regulation of the alpha-mannosidase gene in *Dictyostelium discoideum*: control is at the level of transcription and is affected by cell density. *Molecular and cellular biology*, 11(6), pp.3339–3347.
- Schilde, C., 2004. GSK3 is a multifunctional regulator of *Dictyostelium* development. *Development*, 131(18), pp.4555–4565.
- Schindler, J. & Sussman, M., 1977. Effect of NH₃ on c-AMP associated activities and extracellular c-AMP production in *Dictyostelium discoideum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 79(3), pp.611–617.
- Schulkes, C. & Schaap, P., 1995. cAMP-dependent protein kinase activity is essential for preaggregative gene expression in *Dictyostelium*. *FEBS letters*, 368(2), pp.381–384.
- Segall, J.E. *et al.*, 1995. A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 128(3), pp.405–413.
- Sesaki, H., 1996. Novel Redistribution of the Ca²⁺-Dependent Cell Adhesion Molecule DdCAD-1 during Development of *Dictyostelium discoideum*. pp.1–13.
- Shaulsky, G., Fuller, D. & Loomis, W.F., 1998. A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development*, 125(4), pp.691–699.
- Shaulsky, G. & Kessin, R.H., 2007. The Cold War of the Social Amoebae. *Current Biology*, 17(16), pp.R684–R692.
- Shemarova, I.V., 2009. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(1), pp.23–42.
- Shi, Yujiang & Shi, Yang, 2004. Metabolic enzymes and coenzymes in transcription – a direct link between metabolism and transcription? *Trends in Genetics*, 20(9), pp.445–452.
- Shimomura, O., Suthers, H.L. & Bonner, J.T., 1982. Chemical identity of the acrasin of the cellular slime mold *Polysphondylium violaceum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(23), pp.7376–7379.
- Siol, O., Dingermann, T. & Winckler, T., 2006. The C-module DNA-binding factor mediates expression of the dictyostelium aggregation-specific adenylyl cyclase ACA. *Eukaryotic Cell*, 5(4), pp.658–664.
- Siu, C.H., Lam, T.Y. & Wong, L.M., 1988. Expression of the contact site A glycoprotein in *Dictyostelium discoideum*: quantitation and developmental regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 968(3), pp.283–290.
- Siu, C.H. & Kamboj, R.K., 1990. Cell-cell adhesion and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*.

- Developmental genetics*, 11(5-6), pp.377–387.
- Siu, C.H. *et al.*, 2004. Regulation of cell–cell adhesion during *Dictyostelium* development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(6), pp.633–641.
- Siu, C.H. *et al.*, 2011. Regulation of spatiotemporal expression of cell-cell adhesion molecules during development of *Dictyostelium discoideum*. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.518–527.
- Soede, R.D. *et al.*, 1994. Extracellular cAMP can restore development in *Dictyostelium* cells lacking one, but not two subtypes of early cAMP receptors (cARs). Evidence for involvement of cAR1 in aggregative gene expression. *Development*, 120(7), pp.1997–2002.
- Souza, G.M., Lu, S. & Kuspa, A., 1998. YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development*, 125(12), pp.2291–2302.
- Souza, G.M., da Silva, A.M. & Kuspa, A., 1999. Starvation promotes *Dictyostelium* development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development*, 126(14), pp.3263–3274.
- Söderbom, F. *et al.*, 1999. An adenylyl cyclase that functions during late development of *Dictyostelium*. *Development*, 126(23), pp.5463–5471.
- Sriskanthadevan, S. *et al.*, 2011. The cell adhesion molecule DdCAD-1 regulates morphogenesis through differential spatiotemporal expression in *Dictyostelium discoideum*. *Development*, 138(12), pp.2487–2497.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), pp.2688–2690.
- Stammers, D.K. *et al.*, 2001. The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *The EMBO Journal*, 20(23), pp.6619–6626.
- Strmecki, L., Greene, D.M. & Pears, C.J., 2005. Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 284(1), pp.25–36.
- Sucgang, R. *et al.*, 1997. Null mutations of the *Dictyostelium* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Developmental Biology*, 192(1), pp.181–192.
- Sun, T.J. & Devreotes, P.N., 1991. Gene targeting of the aggregation stage cAMP receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *Genes & Development*, 5(4), pp.572–582.
- Sutherland E.W., Rall T.W., 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry*, 232, pp.1077–1091.
- Taminato, A. *et al.*, 2002. Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. *Molecular biology of the cell*, 13(7), pp.2266–2275.
- Tang, L., 2001. A Cell Number-counting Factor Regulates Group Size in *Dictyostelium* by Differentially Modulating cAMP-induced cAMP and cGMP Pulse Sizes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), pp.27663–27669.
- Tang, L. *et al.*, 2002. A cell number-counting factor regulates the cytoskeleton and cell motility in

- Dictyostelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), pp.1371–1376.
- Tang, Y. & Gomer, R.H., 2008. A Protein with Similarity to PTEN Regulates Aggregation Territory Size by Decreasing Cyclic AMP Pulse Size during *Dictyostelium discoideum* Development. *Eukaryotic Cell*, 7(10), pp.1758–1770.
- Thadani, V., Pan, P. & Bonner, J.T., 1977. Complementary effects of ammonia and cAMP on aggregation territory size in the cellular slime mold *Dictyostelium mucoroides*. *Experimental Cell Research*, 108(1), pp.75–78.
- Theibert, A. & Devreotes, P.N., 1984. Adenosine and its derivatives inhibit the cAMP signaling response in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 106(1), pp.166–173.
- Thomason, P., Traynor, D. & Kay, R., 1999. Taking the plunge. Terminal differentiation in *Dictyostelium*. *Trends in genetics : TIG*, 15(1), pp.15–19.
- Thompson, C.R. & Kay, R.R., 2000. Cell-fate choice in *Dictyostelium*: intrinsic biases modulate sensitivity to DIF signaling. *Developmental Biology*, 227(1), pp.56–64.
- Tian, W.N. *et al.*, 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of biological chemistry*, 273(17), pp.10609–10617.
- Traynor, D., Kessin, R.H. & Williams, J.G., 1992. Chemotactic sorting to cAMP in the multicellular stages of *Dictyostelium* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), pp.8303–8307.
- Todd, R.B. *et al.*, 2005. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryotic Cell*, 4(10), pp.1646–1653.
- Tomchik, J., Devreotes, N., 1981. Adenosine 3',5'-monophosphate waves in *Dictyostelium discoideum*: a demonstration by isotope dilution--fluorography. *Science*, 212, pp.443–6.
- Torija, P., 2006a. Functional genomics in *Dictyostelium*: MidA, a new conserved protein, is required for mitochondrial function and development. *Journal of Cell Science*, 119(6), pp.1154–1164.
- Torija, P., Robles, A. & Escalante, R., 2006b. Optimization of a large-scale gene disruption protocol in *Dictyostelium* and analysis of conserved genes of unknown function. *BMC microbiology*, 6, p.75.
- Tresse, E. *et al.*, 2008. A UDP-glucose derivative is required for vacuolar autophagic cell death. *Autophagy*, 4(5), pp.680–691.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R. & Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), pp.5116–5121.
- Urushihara, H., 2004. Analyses of cDNAs from growth and slug stages of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Research*, 32(5), pp.1647–1653.
- Urushihara, H., 2009. The cellular slime mold: eukaryotic model microorganism. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 58(2), pp.97–104.
- Van Es, S. *et al.*, 1996. Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. *The Journal of biological chemistry*, 271(39), pp.23623–23625.

- Van Haastert, P.J., van Lookeren Campagne, M.M. & Ross, F.M., 1982. Altered cGMP-phosphodiesterase activity in chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS letters*, 147(2), pp.149–152.
- Van Haastert, P.J., 1983. Binding of cAMP and adenosine derivatives to *Dictyostelium discoideum* cells. Relationships of binding, chemotactic, and antagonistic activities. *The Journal of biological chemistry*, 258(16), pp.9643–9648.
- Van Haastert, P.J., Bishop, J.D. & Gomer, R.H., 1996. The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 134(6), pp.1543–1549.
- Van Haastert, P.J.M. & Devreotes, P.N., 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(8), pp.626–634.
- Van Haastert, P.J.M., 2006. Analysis of signal transduction: formation of cAMP, cGMP, and Ins(1,4,5)P₃ in vivo and in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 346, pp.369–392.
- Varnum, B. & Soll, D.R., 1984. Effects of cAMP on single cell motility in *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 99(3), pp.1151–1155.
- Vauti, F. *et al.*, 1990. Regulation of the Discoidin I gamma gene in *Dictyostelium discoideum*: identification of individual promoter elements mediating induction of transcription and repression by cyclic AMP. *Molecular and cellular biology*, 10(8), pp.4080–4088.
- Veltman, D.M., Keizer-Gunnik, I. & van Haastert, P.J.M., 2008. Four key signaling pathways mediating chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Cell Biology*, 180(4), pp.747–753.
- Verkerke-van Wijk, I., 2001. Adenylyl Cyclase A Expression Is Tip-Specific in *Dictyostelium* Slugs and Directs StatA Nuclear Translocation and CudA Gene Expression. *Developmental Biology*, 234(1), pp.151–160.
- Viridy, K.J. *et al.*, 1999. High cAMP in spores of *Dictyostelium discoideum*: association with spore dormancy and inhibition of germination. *Microbiology Reading, England*, 145 (Pt 8), pp.1883–1890.
- Vuillemin, P., 1903. Une Acrasiee bacteriophage. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 137, pp.387–389.
- Wallace, M.A. & Raper, K.B., 1979. Genetic exchanges in the macrocysts of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of general microbiology*, 113(2), pp.327–337.
- Wang, N. *et al.*, 1996. A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *The EMBO Journal*, 15(15), pp.3890–3898.
- Wang, B. & Kuspa, A., 1997. *Dictyostelium* Development in the Absence of cAMP. *Science*, 277(5323), pp.251–254.
- Wang, H.Y. & Williams, J.G., 2010. Identification of a target for CudA, the transcription factor which directs formation of the *Dictyostelium* tip organiser. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(1), pp.161–165.
- Wang, Y., Chen, C.-L. & Iijima, M., 2011. Signaling mechanisms for chemotaxis. *Development, growth & differentiation*, 53(4), pp.495–502.

- Watts, D.J. & Ashworth, J.M., 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochemical Journal*, 119(2), pp.171–174.
- Weening, K., 2003. Contrasting activities of the aggregative and late PDSA promoters in *Dictyostelium* development. *Developmental Biology*, 255(2), pp.373–382.
- Weijer, C.J., Duschl, G. & David, C.N., 1984. Dependence of cell-type proportioning and sorting on cell cycle phase in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Science*, 70, pp.133–145.
- Weijer, C.J., 2004. *Dictyostelium* morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(4), pp.392–398.
- Weijer, C.J., 2009. Collective cell migration in development. *Journal of Cell Science*, 122(18), pp.3215–3223.
- Willard, S.S. & Devreotes, P.N., 2006. Signaling pathways mediating chemotaxis in the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*. *European Journal of Cell Biology*, 85(9-10), pp.897–904.
- Williams, J.G., Noegel, A.A. & Eichinger, L., 2005. Manifestations of multicellularity: *Dictyostelium* reports in. *Trends in Genetics*, 21(7), pp.392–398.
- Williams, J.G., 2006. Transcriptional regulation of *Dictyostelium* pattern formation. *EMBO reports*, 7(7), pp.694–698.
- Williams, R.S.B. *et al.*, 1999. Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *The EMBO Journal*, 18(10), pp.2734–2745.
- Williams, R.S.B. *et al.*, 2002. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*, 417(6886), pp.292–295.
- Williams, R.S.B. *et al.*, 2006. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends in molecular medicine*, 12(9), pp.415–424.
- Wilson, R.A. *et al.*, 2007. Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *The EMBO Journal*, 26(15), pp.3673–3685.
- Winckler, T. *et al.*, 2004. CbfA, the C-module DNA-binding factor, plays an essential role in the initiation of *Dictyostelium discoideum* development. *Eukaryotic Cell*, 3(5), pp.1349–1358.
- Wong, E.F. *et al.*, 1996. Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*, 271(27), pp.16399–16408.
- Wong, E.F. *et al.*, 2002. Disruption of the gene encoding the cell adhesion molecule DdCAD-1 leads to aberrant cell sorting and cell-type proportioning during *Dictyostelium* development. *Development*, 129(16), pp.3839–3850.
- Wong, K.H. *et al.*, 2007. Transcriptional control of NmrA by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 66(2), pp.534–551.
- Wong, C.C. *et al.*, 2011. Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*, 118(16), pp.4305–4312.
- Wu, L. & Franke, J., 1990. A developmentally regulated and cAMP-repressible gene of *Dictyostelium*

- discoideum*: cloning and expression of the gene encoding cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor. *Gene*, 91(1), pp.51–56.
- Wu, L., Hansen, D., *et al.*, 1995a. Regulation of *Dictyostelium* early development genes in signal transduction mutants. *Developmental Biology*, 171(1), pp.149–158.
- Wu, L., Franke, J., *et al.*, 1995b. The phosphodiesterase secreted by prestalk cells is necessary for *Dictyostelium* morphogenesis. *Developmental Biology*, 167(1), pp.1–8.
- Xiao, Z. *et al.*, 1999. Desensitization of G-protein-coupled receptors. agonist-induced phosphorylation of the chemoattractant receptor cAR1 lowers its intrinsic affinity for cAMP. *The Journal of biological chemistry*, 274(3), pp.1440–1448.
- Xu, Q. & Shaulsky, G., 2005. GOAT: An R Tool for Analysing Gene Ontology (TM) Term Enrichment. *Applied Bioinformatics*, 4 (4), pp.281–283.
- Yamada, Y. *et al.*, 2005. Novel patterns of the gene expression regulation in the prestalk region along the antero-posterior axis during multicellular development of *Dictyostelium*. *Gene Expression Patterns*, 6(1), pp.63–68.
- Yamada, Y. *et al.*, 2010. A new *Dictyostelium* prestalk cell sub-type. *Developmental Biology*, 339(2), pp.390–397.
- Yang, C. *et al.*, 1997. Synthesis of the Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule DdCAD-1 is regulated by multiple factors during *Dictyostelium* development. *Differentiation*, 61(5), pp.275–284.
- Yeh, R.P., Chan, F.K. & Coukell, M.B., 1978. Independent regulation of the extracellular cyclic AMP phosphodiesterase-inhibitor system and membrane differentiation by exogenous cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 66(2), pp.361–374.
- Yuen, I.S. *et al.*, 1995. A density-sensing factor regulates signal transduction in *Dictyostelium*. *The Journal of Cell Biology*, 129(5), pp.1251–1262.
- Zhao, Y. *et al.*, 2008. An NADPH sensor protein (HSCARG) down-regulates nitric oxide synthesis by association with argininosuccinate synthetase and is essential for epithelial cell viability. *The Journal of biological chemistry*, 283(16), pp.11004–11013.
- Zhao, X. *et al.*, 2010. The transcription repressor NmrA is subject to proteolysis by three *Aspergillus nidulans* proteases. *Protein Science*, 19(7), pp.1405–1419.
- Zheng, X. *et al.*, 2007. Restructuring of the dinucleotide-binding fold in an NADP(H) sensor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), pp.8809–8814.
- Zhukovskaya, N.V. *et al.*, 2006. The *Dictyostelium* bZIP transcription factor DimB regulates prestalk-specific gene expression. *Development*, 133(3), pp.439–448.
- Zouwail, S. *et al.*, 2005. Phospholipase D activity is essential for actin localization and actin-based motility in *Dictyostelium*. *Biochemical Journal*, 389(Pt 1), pp.207–214.

(...) "Development... is in essence the interaction between parts... But if the individual merges into an association of individuals, then there will be an extension of the principle of development to include these larger associations, for here also the colony of the society is integrated and unified by the interaction between parts. If in evolution there has been... an increase in the compounding of living units (into colonies, multicellular organisms and societies) then there must also have been a corresponding extension of development".

(J.T. Bonner, 1958)

